

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jasmina JEGLIČ

**FERMENTACIJSKE LASTNOSTI VINSKIH
KVASOVK IN MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jasmina JEGLIČ

**FERMENTACIJSKE LASTNOSTI VINSKIH KVASOVK IN
MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FERMENTATION CHARACTERISTICS OF VINE YEASTS AND
LACTIC ACID BACTERIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za tehnologije, prehrano in vino na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študije 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Košmerl, za somentorico asist. dr. Petro Terpinc in za recenzentko doc. dr. Nežo Čadež.

Mentorica: prof. dr. Tatjana KOŠMERL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Somentorica: asist. dr. Petra TERPINC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: doc. dr. Neža ČADEŽ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jasmina Jeglič

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.221:663.252/.253:582.282.23:543.2/.9(043)=163.6
KG	sauvignon /mošt/ mlado vino/ starterske kulture/ vinske kvasovke/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / alkoholna fermentacija/ mlečnokislinske bakterije/ jabolčno-mlečnokislinska fermentacija/ fizikalnokemijske lastnosti/ kemijska sestava/ senzorične lastnosti
AV	JEGLIČ, Jasmina
SA	KOŠMERL, Tatjana (mentorica)/ TERPINC, Petra (somentorica)/ ČADEŽ, Neža (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	FERMENTACIJSKE LASTNOSTI VINSKIH KVASOVK IN MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XV, 70 str., 7 pregl., 34 sl., 11 pril., 50 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen diplomskega dela je bil spremljati potek alkoholne fermentacije mošta, inokuliranega s komercialnimi sevi vinskih kvasovk vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> samostojno in v kombinaciji z mlečnokislinskimi bakterijami ter hranili. S primerjalno analizo pridelanih vin sorte sauvignon, letnika 2015, smo želeli ugotoviti značilne razlike v poteku alkoholne fermentacije, vpliv različnih sevov kvasovk na potek alkoholne fermentacije, fizikalno-kemijske parametre in senzorično kakovost vina. Potek alkoholne fermentacije smo periodično spremljali gravimetrično s tehtanjem oddanega ogljikovega dioksida, na podlagi česar smo izrisali fermentacijske krivulje in krivulje kemijske kinetike. Po končani alkoholni fermentaciji smo po z instrumentom WineScan opravili vrsto fizikalno-kemijskih analiz mladega vina, kot so: relativna gostota, vsebnost alkohola, koncentracija skupnega suhega in sladkorja prostega ekstrakta, vrednost pH, vsebnosti reducirajočih sladkorjev, koncentracije skupnih, hlapnih ter posameznih organskih kislin (vinske, jabolčne, mlečne in citronske kisline). Naknadno smo določili fenolne spojine v vinu, antioksidativni potencial vina, izračunali fermentacijsko učinkovitost, mikroskopsko pregledali nastale usedline vina (droži) in mlado vino tudi senzorično analizirali. Ugotovili smo, da dodatek startrskih kultur vinskih kvasovk in hranila za kvasovke ugodno vplivata na potek in dokončanje alkoholne fermentacije. Dodatek hranil omogoči kvasovkam hitrejšo in učinkovitejšo pretvorbo sladkorjev, takšna vina imajo bistveno manjši preostanek reducirajočih sladkorjev, posledično manjšo vsebnost suhega skupnega ekstrakta in večjo alkoholno stopnjo. Mlečnokislinske bakterije (MKB) ne vplivajo na fermentacijsko sposobnost vinskih kvasovk, vendar so ključni dejavnik pri poteku jabolčno-mlečnokislinske fermentacije (MLF).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 663.221:663.252/.253:582.282.23:543.2/.9(043)=163.6
CX Sauvignon/ musts/ young wines/ starter cultures/ wine yeasts/ *Saccharomyces cerevisiae*/ alcoholic fermentation/ lactic acid bacteria/ malolactic fermentation / physicochemical properties/ chemical composition/ sensory properties
AU JEGLIČ, Jasmina
AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor)/ TERPINC, Petra (co-advisor)/ ČADEŽ, Neža (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Tehnology
PY 2016
TI FERMENTATION CHARACTERISTICS OF WINE YEASTS AND LACTIC ACID BACTERIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XV, 70 p., 7 tab., 34 fig., 11 ann., 50 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of the diploma paper was to monitor the course of grape must alcohol fermentation inoculated with commercial wine yeasts strains of *Saccharomyces cerevisiae* species independently and in combination with yeast nutrients and lactic acid bacteria. With the comparative analysis of produced young wines Sauvignon of vintage 2015, we determined the characteristic differences in the kinetics of alcohol fermentation, the influence of different yeasts strains on alcoholic fermentation, physical-chemical parameters and sensory quality of wine. We were periodically monitoring the course of alcoholic fermentation with gravimetric determination of released carbon dioxide, on the basis of which we drew the fermentation curves and the curves of alcoholic fermentation. After the completion of alcoholic fermentation we performed several physical-chemical analyses of young wine by WineScan instrument, such as: relative density, alcohol level, concentrations of total dry and sugar-free extract, pH value, contents of reducing sugars, total acids, volatile and individual organic acids (tartaric, malic, lactic and citric acids). Subsequently we determined total phenolic compounds and antioxidant potential of wine; we calculated fermentation efficiency, microscopically examined the wine sediments (lees) and also made a sensory analysis of young wine. We established that the addition of wine yeast starter cultures and yeast nutrients favourably affect the course and the completion of alcohol fermentation. The addition of nutrients enabled yeasts to convert sugars faster and more efficiently; such wines have significantly lower content of reducing sugars and consequently lower content of total dry extract and higher level of alcohol. Lactic acid bacteria (LAB) do not influence the fermentation capacity of wine yeasts; however, they are a key factor for the course of malolactic fermentation (MLF).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 FIZIKALNO-KEMIJSKA SESTAVA MOŠTA	3
2.1.1 Voda	3
2.1.2 Ogljikovi hidrati (sladkorji)	3
2.1.2.1 Monosaharidi	3
2.1.2.2 Disaharidi	4
2.1.2.3 Polisaharidi	5
2.1.3 Organske kisline	5
2.1.3.1 Vinska kislina ($C_4H_6O_6$)	7
2.1.3.2 Jabolčna kislina ($C_4H_6O_5$)	7
2.1.3.3 Mlečna kislina ($C_3H_6O_3$)	7
2.1.3.4 Citronska kislina ($C_6H_6O_6$)	8
2.1.3.5 Ocetna kislina (C_2H_4O)	8
2.1.3.6 Ostale kisline v moštu in vinu	8
2.1.4 Mineralne snovi	8

2.1.5	Dušikove spojine	9
2.1.6	Pektinske snovi.....	9
2.1.7	Fenolne spojine	9
2.2	ALKOHOLNA FERMENTACIJA	10
2.2.1	Grozdna mikrobiota	11
2.2.1.1	Bakterije	11
2.2.1.2	Plesni.....	12
2.2.1.3	Kvasovke	12
2.3	VINSKE KVASOVKE IN NJIHOVA VLOGA MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO	13
2.3.1	Splošne značilnosti vinskih kvasovk	13
2.3.2	Vinske kvasovke vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2.3.3	Dodatek startrske kulture vinskih kvasovk	14
2.3.4	Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk.....	15
2.3.5	Fizikalno-kemijske razmere med alkoholno fermentacijo	16
2.4	STARTRSKE KULTURE VINSKIH KVASOVK	16
2.4.1	Osnovne lastnosti startrskih kultur vinskih kvasovk.....	16
2.4.2	Zahteve za industrijsko produkcijo startrskih kultur	17
2.5	JABOLČNO-MLEČNOKISLINSKA FERMENTACIJA (MLF)	17
2.5.1	Mlečnokislinske bakterije (MKB).....	18
2.5.2	Mlečnokislinske bakterije vrste <i>Oenococcus oeni</i>	18
2.5.3	Vloga jabolčno-mlečnokislinske fermentacije	18
2.5.4	Vpliv jabolčno-mlečnokislinske fermentacije na vino.....	19
3	MATERIAL IN METODE DELA	20
3.1	ZASNOVA POSKUSA	20
3.2	MATERIAL	21
3.2.1	Mošt	21
3.2.2	Startrske kulture	21
3.2.2.1	Kvasovke	21
3.2.2.2	Mlečnokislinske bakterije	21

3.2.2.3	Hranilo za kvasovke.....	22
3.3	METODE DELA	22
3.3.1	Postavitev fermentacijskega poskusa	22
3.3.2	Fizikalno-kemijske analize mošta	24
3.3.2.1	Analiza osnovne kemijske sestave mošta z WineScan TM	24
3.3.3	Fizikalno-kemijske analize vina	24
3.3.3.1	Analiza osnovne kemijske sestave vina z WineScan TM	24
3.3.3.2	Določanje fenolnih spojin v vinu	25
3.3.3.3	Določanje antioksidativnega potenciala v vinu	26
3.3.3.1	Izračun fermentacijske učinkovitosti	27
3.3.4	Mikrobiološke analize droži	27
3.3.4.1	Mikroskopski pregled droži	27
3.3.5	Senzorične analize vina	27
3.3.5.1	20-točkovna Buxbaumova metoda	27
3.3.5.2	Hitro profiliranje (Flash profiling).....	28
3.3.5.3	Ocenjevanje arome vina z metodo CATA	28
3.3.5.4	Ocenjevanje všečnosti z 9-točkovno hedonsko lestvico	28
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	29
4.1	REZULTATI ANALIZ MOŠTA.....	29
4.1.1	Rezultati analize mošta z analizo WineScan TM	29
4.2	SPREMLJANJE KINETIKE ALKOHOLNIH FERMENTACIJ	30
4.3	REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH ANALIZ MLADEGA VINA	39
4.3.1	Fizikalno-kemijske karakteristike mladega vina, določene z analizo WineScan.....	39
4.3.2	Vsebnost skupnih fenolnih spojin	53
4.3.3	Antioksidativni potencial mladega vina	54
4.3.4	Izračun fermentacijske učinkovitosti.....	56
4.3.5	Mikroskopiranje kvasnih celic droži	56

4.3.6	Rezultati senzoričnih analiz mladega vina	58
5	SKLEPI	63
6	POVZETEK.....	64
7	VIRI.....	67

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Osnovni selekcijski kriteriji vinskih kvasovk in cilji selekcije (Košmerl, 2007)	15
Preglednica 2: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk (Košmerl, 2007)	16
Preglednica 3: Uporabljeni dodatki komercialnih starttrskih kultur in hranila.....	22
Preglednica 4: Standardne raztopine galne kisline (Košmerl in Kač, 2007)	25
Preglednica 5: Rezultati analize mošta z WSC metodo, na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica	29
Preglednica 6: Rezultati WineScan analize za vzorce mladihpridelanih vin.....	52
Preglednica 7: Prikaz opisa arome in vzorcev, ki pripadajo določeni senzorični lastnosti, po metodi CATA.....	70

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz poteka poskusa.....	20
Slika 2: Fermentacijske steklenice, napolnjene z moštom in priprava inokuluma (vrelnega nastavka).....	23
Slika 3: Fermentacijske steklenice takoj po inokulaciji.....	23
Slika 4: Fermentacijske steklenice 48 ur po inokulaciji	23
Slika 5: Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin.....	26
Slika 6: Fermentacijske krivulje vzorcev 2 (kvasovka Lalvin ICV OKAY), 3 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) in 4 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 1)... ..	31
Slika 7: Krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev 2 (kvasovka Lalvin ICV OKAY), 3 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) in 4 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 1).....	32
Slika 8: Fermentacijske krivulje vzorcev 9 (kvasovka Lalvin ICV OKAY), 10 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) in 11 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 8).....	33
Slika 9: Krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev 9 (kvasovka Lalvin ICV OKAY), 10 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) in 11(kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 8).....	34
Slika 10: Fermentacijske krivulje vzorcev 5 (kvasovka Uvaferm SLO), 6 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo) in 7 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 1).. ..	35
Slika 11: Krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev 5 (kvasovka Uvaferm SLO), 6 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo) in 7 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 1).. ..	36
Slika 12: Fermentacijske krivulje vzorcev 12 (kvasovka Uvaferm SLO), 13 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo) in 14 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 8).. ..	37

Slika 13: Krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev 12 (kvasovka Uvaferm SLO), 13 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo) in 14 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 8)..
..... 38

Slika 14: Rezultati določitve vrednosti relativne gostote v mladem vinu, opravljene z WineScanTM analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)..... 40

Slika 15: Rezultati določitve alkohola (vol.%) v mladem vinu, opravljene z WineScanTM analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 41

Slika 16: Rezultati določitve koncentracije skupnega suhega ekstrakta (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScanTM analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 42

Slika 17: Rezultati določitve koncentracije reducirajočih sladkorjev (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScanTM analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 43

Slika 18: Rezultati določitve koncentracije sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScanTM analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 44

Slika 19: Rezultati določitve koncentracije skupnih kislin (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScanTM analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)..... 45

Slika 20: Rezultati določitve koncentracije hlapnih kislin (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScanTM analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo +

MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)..... 46

Slika 21: Rezultati določitve vrednosti pH v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 47

Slika 22: Rezultati določitve koncentracije jabolčne kisline (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 48

Slika 23: Rezultati določitve koncentracije mlečne kisline (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 49

Slika 24: Rezultati določitve koncentracije vinske kisline (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 50

Slika 25: Rezultati določitve koncentracije glicerola (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB).....51

Slika 26: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni AF (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) 53

Slika 27: AOP (mmol/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni AF..... 55

Slika 28: Koleracija vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) in AOP (mmol DPPH/L) vzorcev mladega vina 55

Slika 29: AOP (mmol/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni AF (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)	56
Slika 30: Mikroskopski posnetek droži vzorca 1 (spontana AF) pri 400-kratni povečavi.....	57
Slika 31: Mikroskopski posnetek droži vzorca 2 (kvasovka Lalvin ICV OKAY) pri 400-kratni povečavi	57
Slika 32: Mikroskopski posnetek droži vzorca 3 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) pri 400-kratni povečavi.....	58
Slika 33: Mikroskopski posnetek droži vzorca 4 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) pri 400-kratni povečavi	58
Slika 34: Skupna ocena senzoričnega ocenjevanja mladih vin po Buxbaumu (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)	60

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca 1 in 8 pri spontani alkoholni fermentaciji

Priloga B: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Lalvin ICV OKAY

Priloga C: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Lalvin ICV OKAY in hranila za kvasovke RESKUE

Priloga D: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Lalvin ICV OKAY, hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemend OMEGA

Priloga E: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Uvaferm SLO

Priloga F: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Uvaferm SLO in hranila za kvasovke RESKUE

Priloga G: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Uvaferm SLO, hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemend OMEGA

Priloga H: Degustacijski list za senzorično ocenjevanje mladih vin po metodi 20-točkovnega sistema po Buxbaumu

Priloga I: Degustacijski list za senzorično ocenjevanje mladih vin po metodi Hitrega profiliranja

Priloga J: Degustacijski list za senzorično ocenjevanje mladih vin po metodi CATA

Priloga K: Degustacijski list za senzorično ocenjevanje mladih vin po metodi Ocenjevanja všečnosti z 9-točkovno hedonsko lestvico

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AF	alkoholna fermentacija
AOP	antioksidativni potencial
ATP	adenozin trifosfat
°Brix	stopinja Brix (enota sladkorne stopnje mošta)
CATA	metoda za senzorično ocenjevanje arome vina (ang. Check All That Apply)
CFU	za rast sposobne celice kvasovk ali bakterij, kolonijska enota (ang. Colony Forming Unit)
DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
FC	Folin-Ciocalteu reagent
FAN	prosti aminokislinski dušik (ang. Free Amino Nitrogen)
GAE	ekvivalent galne kisline
HK	hlapne kisline
MKB	mlečnokislinske bakterije (ang. Lactic Acid Bacteria)
MLF	jabolčno-mlečnokislinska fermentacija (ang. Malolactic Fermentation)
°Oe	Oechslejeva stopinja (enota sladkorne stopnje mošta)
PFT	skupne fenolne snovi
RS	reducirajoči sladkorji
SK	skupne kisline
SPE	sladkorja prosti ekstrakt
SSE	skupni suhi ekstrakt
T	temperatura
TCA	cikel trikarboksilnih kislin
WSC	WineScan analiza
σ	standardni odklon

1 UVOD

Vino je za nekatere ljudi le kislja raztopina etanola v vodi, za druge občasna pijača, za tretje pa dar bogov. Dejstvo je, da so znanstveniki v vinu dokazali že več kot tisoč različnih spojin in še vedno se odkrivajo nove (Bavčar, 2009).

Zgodovina uporabe vinskih kvasovk se začne s pojavom prvih civilizacij. Že leta 7400 pr.n.št. so omenjali kvasovke. Praksa pridelave vina se je iz Sredozemlja postopoma razširila po celem svetu, na klimatsko ugodna področja za rast vinske trte. Fermentacija mošta ni bila poznana vse do leta 1863, ko je Louis Pasteur dokazal, da so kvasovke odgovorne za biotransformacijo sladkorjev v etanol in CO₂ (Pretorius, 2002).

Alkoholna fermentacija grozdnega soka v vino je kompleksen mikrobiološki proces, nadzorovan s strani kvasovk in mlečnokislinskih bakterij. Prav kvasovke so v vinarstvu zdaleč največjega pomena, saj imajo sposobnost pretvorbe grozdnega sladkorja (glukoze in fruktoze) v etanol, ogljikov dioksid in ostale pomembne metabolite, ki so zastopani v manjših koncentracijah. Proces, imenovan alkoholna fermentacija, je posledica metabolnega delovanja vinskih kvasovk, katere uvrščamo v rod *Saccharomyces*. Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so glavne kvasovke, ki so udeležene pri alkoholni fermentaciji mošta, zato jih imenujemo tudi vinske kvasovke. V vinarstvu se uporabljajo selekcionirani sevi kvasovk vrste *S. cerevisiae* kot startrske kulture za inokulacijo mošta, iz katerega le-ti proizvedejo vino. Mlečnokislinske bakterije razgrajujejo jabolčno kislino v milejšo mlečno kislino in ogljikov dioksid med procesom, imenovanim jabolčno-mlečnokislinska fermentacija (Pretorius, 2002; Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Čeprav je etanol glavni produkt alkoholne fermentacije mošta, deluje inhibitorno na celice, ki ga proizvajajo in predstavlja zanje velik stresni dejavnik med fermentacijo. Etanol lahko prosto prehaja plazemsko membrano kvasovk in poškoduje membranske proteine, fosfolipidni dvosloj, intracelularne encime in celične strukture, posledica tega pa je povečana prepustnost ali permeabilnost membrane in pasivni prehod protonov v celico (Berthels in sod., 2004).

Med dejavnike, ki vplivajo na hitrost rasti kvasovk med alkoholno fermentacijo, prištevamo dodatek startrske kulture, temperaturo fermentacije, žveplanje, prisotnost ali uporabo kvasovk z zimocidno aktivnostjo, motnost oziroma stopnjo bistrosti mošta, fizikalno-kemijsko sestavo mošta, ostanke zaščitnih sredstev (fungicidi) ter vpliv ostalih mikroorganizmov, zlasti plesni in bakterij (mlečno- in očetnokislinskih) (Košmerl, 2007).

Poznavanje vpliva posameznega seva kvasovk na potek fermentacije in na izoblikovanje specifičnih lastnosti vina je ključnega pomena pri pridelavi kakovostnega vina (Košmerl, 2007).

1.1 NAMEN DELA

Cilj naloge je spremljati potek alkoholne fermentacije mošta z inokulacijo komercialnih sevov vinskih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* samostojno in v kombinaciji z mlečnokislinskimi bakterijami ter hranili. S primerjalno analizo vina sorte sauvignon, letnika 2015 želimo ugotoviti značilne razlike v poteku alkoholne fermentacije, vpliv različnih vrst kvasovk na alkoholno fermentacijo, fizikalno-kemijske parametre in senzorično kakovost vina.

Poleg tehnološkega dela bomo opravili vrsto fizikalno-kemijskih analiz mošta in vina, kot so: relativna gostota, alkohol, skupni suhi in sladkorja prosti ekstrakt, pH, reducirajoči sladkorji, skupne kisline, hlapne kisline in posamezne organske kisline (vinska, jabolčna, mlečna in citronska kislina), glicerol in FC indeks. Potek alkoholne fermentacije bomo periodično spremljali gravimetrično s tehtanjem oddanega ogljikovega dioksida, na podlagi česar bomo izrisali fermentacijske krivulje in krivulje kemijske kinetike skupno 14-ih fermentacij. Naknadno bomo določili fenolne spojine v vinu, antioksidativni potencial ter vino tudi senzorično analizirali z metodo ocenjevanja po veljavnem 20-točkovnem sistemu po Buxbaumu, z metodo hitrega profiliranja (Flash profiling), z ocenjevanjem všečnosti z 9-točkovno hedonsko lestvico in z ocenjevanjem arome vina z metodo CATA (Check All That Apply).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V okviru uporabljenih dveh različnih sevov kvasovk in seva mlečnokislinskih bakterij, pričakujemo razlike v kinetiki alkoholne fermentacije, trajanju lag faze prilagajanja kvasovk, poteku in dokončanju fermentacije. Predvidevamo, da bodo kvasovke ob prisotnosti hranil optimalnejše delovale, ter da dodatek mlečnokislinskih bakterij v mošt ne bo značilno vplival na aktivnost vinskih kvasovk. Pričakujemo tudi razlike v fizikalno-kemijskih parametrih vina po končani alkoholni fermentaciji in v njegovi senzorični kakovosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FIZIKALNO-KEMIJSKA SESTAVA MOŠTA

Sestava grozdnega mošta je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na rast in metabolizem kvasovk, s tem pa tudi na hitrost (zmanjšanje sladkorja) alkoholne fermentacije (Košmerl, 2007).

2.1.1 Voda

Vino vsebuje 75–85 % vode, zato je količinsko med njegovimi najbolj zastopanimi spojinami. Povzroči, da se vino obnaša kot tekočina, deluje kot topilo in kot reagent v kemijskih reakcijah skozi celoten proces pridelave vina (Bavčar, 2009).

2.1.2 Ogljikovi hidrati (sladkorji)

Glavni produkt fotosinteze, katera poteka v vseh zelenih delih vinske trte, so sladkorji.



Ogljikovi hidrati se zaradi svoje hidrofilnosti v vodi dobro topijo. Sestavljajo jih polifunkcionalne molekule, katere so vpletene v mnoge kemijske, biokemijske ter metabolne reakcije in so prekurzorji za nekatere organske kisline, fenole ter aromatske aminokisline. Na vsebnost sladkorja v moštu močno vpliva stopnja zrelosti, ki jo ob trgatvi doseže grozdje (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a). V povprečju sestavljajo 12–27 % celotne količine mošta (Johnson, 2003).

V grozdju, moštu in vinu se nahajajo (Bavčar, 2009):

- monosaharidi: heksoze (glukoza, fruktoza) in pentoze (arabinoza, ksiloza in ramnoza),
- disaharidi (saharoza),
- polisaharidi (pektini, glukan, škrob, dekstrani).

2.1.2.1 Monosaharidi

- Heksoze ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)

Po količini najbolj zastopani ogljikovi hidrati v moštu in vinu so heksoze. Nastajajo med procesom fotosinteze v zelenih delih vinske trte. So glavni substrat za kvasovke med alkoholno fermentacijo, saj jim predstavljajo najpomembnejši vir energije pri tvorbi alkoholov. V vinu najpomembnejši heksozi sta glukoza in fruktoza, kateri sta sestavljeni iz šestih ogljikovih atomov, ločita se le po lokaciji funkcionalne karbonilne skupine. Na vsebnost glukoze in fruktoze v moštu imajo velik vpliv številni dejavniki, kot so sorta,

stopnja zrelosti grozdja, klimatske razmere, tla, agrotehnični ukrepi in morebitna prisotnost plesni. Njuna koncentracija v moštu je običajno med 180 in 220 g/L. Najpomembnejši podatek, s katerim lahko določimo stopnjo zrelosti grozdja, je prav njuna skupna vsebnost. Razmerje med glukozo in fruktozo se tekom dozorevanja grozdja spreminja, saj je na začetku v prednosti glukoza, v polni zrelosti se razmerje med tema dvema sladkorjema izenači, nato pa prične naraščati koncentracija fruktoze. Reducirajoči sladkorji v moštu pomembno vplivajo na senzorične lastnosti vina (Bavčar, 2009).

Poleg teh dveh glavnih sladkorjev so v moštu tudi zastopane količinsko majhne vsebnosti manoze in galaktoze (Šikovec, 1993).

Glukoza (grozdni sladkor, dekstroza)

Glukoza je kristalna snov bele barve in je sladkega okusa. Zelo dobro se topi v vodi, zato je v moštu prisotna v topni obliki. Z oksidacijo lahko preide v glukonsko kislino in naprej v glukarko. Uvrščamo jo med aldoze. Je vir prehrane kvasovkam, katere tvorijo etanol, mlečnokislinskim bakterijam, katerih produkt je mlečna kislina ali plesnim, ki glukozo pretvarjajo v različne snovi, med katerimi je tudi citronska kislina (Milek, 2001).

Fruktoza (sadni sladkor, levuloza)

Fruktozo uvrščamo med ketoze, katera ima karbonilno skupino vezano na drugem mestu. Je spremljevalka glukoze, v vodi je topna in težko kristalizira v brezvodne kristale. Po okusu je dvakrat slajša od glukoze. Kvasovke jo povrevajo v etanol in ogljikov dioksid, mlečnokislinske bakterije pa jo pretvarjajo v manit, kar povzroči bolezni vina (Milek, 2001).

- Pentoze ($C_5H_{10}O_5$)

Pentoz najdemo v vinu mnogo manj, kot heksoz. Ker jih kvasovke ne morejo porabiti kot substrat, predstavljajo tako imenovane nefermentabilne sladkorje. Glavne pentoze v vinu so ksiloza, ramnoza in arabinoza, slednja predstavlja tudi najvišjo vsebnost med pentozami v vinu. Njena koncentracija je v vinih, pridelanih iz grozdja, ki je okuženo s plesnijo vrste *Botrytis cinerea*, podvojena (Bavčar, 2009).

2.1.2.2 Disaharidi

Saharoza (namizni sladkor, sukroza)

Od disaharidov ima v tehnologiji vina pomen edino saharoza (Radovanović, 1986). V moštu ga najdemo, kot enega najpomembnejših disaharidov, katerega sestavljata monosaharida glukoza in fruktoza. Njene vsebnosti so v moštu dokaj nizke (2–5 g/L). Saharoza nastaja med procesom fotosinteze v listih vinske trte, nekaj pa je izvira iz njenih vej v obliki rezerv, kot sta celuloza in škrob (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a). Kvasovke je

ne morejo porabiti direktno, zato le-te izločajo encim, imenovan invertaza, katera omogoči hidrolizo saharoze v glukozo in fruktozo (Bavčar, 2009).

2.1.2.3 Polisaharidi

V grozdju najdemo polisaharide v obliki celuloze in pektina (strukturna funkcija) ali v obliki škroba (energetska funkcija). V vinu se nahajajo zaradi mletja in stiskanja grozdja, lahko pa so prisotni zaradi posledice delovanja nekaterih mikroorganizmov. V tehnologiji vina povzročajo težave pri filtraciji in bistrenju vina. Najpomembnejši polisaharidi so celuloza, hemiceluloza, pektin in glukani. Slednji nastanejo kot posledica okužbe grozdne jagode s plesnijo vrste *Botrytis cinerea*. Ti glukani preprečujejo čiščenje vina ter otežujejo filtracijo zaradi tvorbe vlaken, ki zamašijo pore (Bavčar, 2009).

2.1.3 Organske kisline

V moštu in vinu najdemo predvsem organske kisline, ki imajo skupaj s sladkorji in ostalimi sestavinami s kislimi lastnostmi zelo pomembno vlogo pri kislosti mošta in vina (Šikovec, 1993).

Organske kisline so spojine, ki primarno prispevajo k sestavi, stabilnosti in organoleptični kakovosti vina, predvsem belih vinskih sort. Njihove kisle lastnosti omogočijo tudi večjo mikrobiološko in fizikalno-kemijsko stabilnost vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2000b), dajejo temeljne značilnosti tehnološki vrednosti vsaki sorti in so soudeležene pri oblikovanju kakovosti vina (Šikovec, 1993).

V vinu so količinsko najbolj zastopane vinska, jabolčna, mlečna in citronska kislina. Njihove skupne vsebnosti so navadno 5,5–8,5 g/L (Jackson, 2008). V vinu so kisline izražene kot skupne, hlapne (ocetna, mravljična, propionska) ter nehlapne (vinska, jabolčna, citronska, mlečna) kisline. Skupne kisline predstavljajo vsoto hlapnih in nehlapnih kislin (Bavčar, 2009).

Previsoke koncentracije kislin v vinu so posledica nedozorelega grozdja, v katerem se delež kislin še ni uspel pretvoriti v sladkor. Jabolčna in vinska kislina sta v dozorelih letnikih zastopani v približno enakih koncentracijah. V nedozorelem grozdju je zaradi večje kislosti jabolčne kisline le-ta zastopana v večji koncentraciji. Kadar vino vsebuje preveč kislin, se njegove senzorične lastnosti izražajo z neharmoničnim, preveč kislim ter rahlo odbijajočim okusom. Kisline v moštu in tiste, ki nastajajo med fermentacijo, so izrednega pomena pri oblikovanju okusa in arome vina. Pomemben vpliv imajo tudi pri številnih fizikalno-kemijskih in biokemijskih procesih, kateri povzročijo, da je kislost vina navadno nižja od kislosti mošta (Bavčar, 2009).

Reducirajoči sladkorji, vsebnost alkohola in različni kationi prekrijejo kislost vina. To lastnost povezujemo z vsebnostjo skupnih (titrabilnih) kislin, z vrednostjo pH, z relativno vsebnostjo disociiranih in nedisociiranih kislin, pufrno kapaciteto in relativno vsebnostjo vsake posamezne kisline (Košmerl in Kač, 2007). Kot navaja Bavčar (2009), so kisline v vinu izrednega pomena, saj močno vplivajo na njegove senzorične lastnosti, pH vrednost in prispevajo k boljši stabilizaciji ter aromatici vina.

Vrednost pH

Vrednost pH predstavlja jasen in določen pojem koncentracije vodikovih ionov, ki so produkt disociacije prostih kislin in kislih soli (Milek, 2001). V bioloških sistemih je določitev koncentracije oziroma aktivnosti H_3O^+ ionov, ki jo izražamo kot pH, pomembnejša od podatka o skupnih kislinah. Vpliv H_3O^+ ionov se kaže v selektivnem delovanju na mikroorganizme, v intenzivnosti in odtenku barve, okusu, oksidacijsko-redukcijskem potencialu, razmerju med prostim in vezanim žveplovim dioksidom, v občutljivosti za pojav motnosti, idr. Med naštetimi parametri je prav pH odločilnega pomena pri pojavu napak in bolezni vina. V običajnih letnikih je pH mošta med 3,1 in 3,6 (Košmerl in Kač, 2007).

Pufurna kapaciteta

Pufurna kapaciteta je lastnost mošta ali vina, pri kateri se ob dodajanju majhnih količin kislin ali baz pH mošta ali vina ne spreminja. Definiramo jo kot množina H_3O^+ ali OH^- ionov, ki jih moramo dodati enemu litru mošta ali vina, da se njegova pH vrednost spremeni za eno enoto. Njena številčna vrednost je obratno sorazmerna naklonu titracijske krivulje v območju pH mošta ali vina. Podatek je pomemben za razumevanje sprememb pH. Enota pufrne kapacitete so moli oksonijevih (H_3O^+) ali hidroksidnih (OH^-) ionov, ki jih dodamo na 1L mošta ali vina, da dosežemo spremembo vrednosti pH za 1 enoto. Zaradi nizkih vrednosti jo izražamo v mmol/L/pH. Običajna vrednost pufrne kapacitete je med 35 in 50 mmol/L/pH (Košmerl in Kač, 2007).

Titribilna kislost

Titribilno kislost izražamo kot vinsko kislino v enotah g/L in predstavlja količino baze, ki je potrebna za nevtralizacijo vseh kislih snovi v moštu ali vinu (Milek, 2001).

Med pH vina in koncentracijo skupnih (titrabilnih) kislin ni enostavne zveze. Poznane so različne zveze med vrednostjo pH in razmerjem nekaterih organskih kislin ter njihovimi kislimi solmi. V grozdju so prisotne nizke vsebnosti šibkih karboksilnih kislin. V času dozorevanja grozdja se značilno zniža njegova koncentracija kislin, posledično se poviša vrednost pH. Koncentracija karboksilnih kislin je izražena kot množina vinske kisline v litru mošta ali vina. Glede na način določanja uporabljamo izraza skupne kisline ter titrabilne kisline. Skupno koncentracijo karboksilnih kislin grozdnega soka, mošta ali vina

izražamo kot g vinske kisline/L, običajne vrednosti so med 6 in 9 g/L (Košmerl in Kač, 2007).

2.1.3.1 Vinska kislina ($C_4H_6O_6$)

Vinske kisline najdemo v grozdju med 5 in 10 g/L mošta in je običajno najbolj zastopana kislina tako v moštu kot v vinu. Skupaj z jabolčno kislino pogosto dosežeta 90 % vseh nehlapnih kislin. Na njeno koncentracijo vplivata sorta grozdja ter končni volumen grozdne jagode v času trgatve in navadno se njena koncentracija ne znižuje tekom dozorevanja grozdja (Bavčar, 2009).

Slabo topne so tudi kalcijeve soli vinske kisline, zlasti sekundarni kalcijev tartrat. Skupaj s primarnim kalijevim tartratom se ta sol izloča delno že v moštu, zlasti med alkoholno fermentacijo in se stopnjuje, kadar le-ta poteka v nizkih temperaturnih razmerah. Zaradi izločanja vinskega kamna, vino pred stekleničenjem stabiliziramo, da se prepreči njegovo izločanje v steklenici (Šikovec, 1993).

Ker mikroorganizmi vinske kisline ne morejo uporabiti kot substrat, jo lahko dodajamo pri dokisanju vina. Zaradi slabe topnosti se izloča kot sol, imenovana tartrat ali vinski kamen, kot jo imenujemo v pogovornem jeziku (Bavčar, 2009).

2.1.3.2 Jabolčna kislina ($C_4H_6O_5$)

Koncentracija jabolčne kisline v grozdju je med 1 in 4 g/L mošta. Na njeno vsebnost vplivajo sorta, temperatura v času dozorevanja ter končni volumen grozdne jagode. Tekom dozorevanja se koncentracija jabolčne kisline v grozdju znižuje, še posebno ob zorenju pri višjih temperaturah. Mikrobiološko je neobstoja, saj jo MKB pretvarjajo v mlečno kislino, v procesu, ki ga imenujemo biološki razkis (Bavčar, 2009).

V grozdju, moštu in vinu je tudi jabolčna kislina večinoma v obliki soli kalija, kalcija in magnezija. V primeru slabo dozorelega grozdja lahko jabolčna kislina prevlada nad vinsko kislino, zato taka vina delujejo neharmonično (Šikovec, 1993).

2.1.3.3 Mlečna kislina ($C_3H_6O_3$)

Vino vsebuje 0-2,5 g/L mlečne kisline, v primeru poteka biološkega razkisa se njene vrednosti lahko zvišajo. Njen nastanek je voden s strani mlečnokislinskih bakterij, v procesu jabolčno-mlečnokislinska fermentacija, v katerem jo MKB pretvarjajo iz jabolčne kisline. Njene soli imenujemo laktati, ki so dobro topne in stabilne (Bavčar, 2009).

V moštih iz nepoškodovanega grozdja je navadno ne najdemo, lahko pa je prisotna v manjših količinah kot D- in L-laktat. D-oblika nastane pri razgradnji ogljikovih hidratov, L-oblika pa nastane pri MLF iz jabolčne kisline (Blašković, 1978).

2.1.3.4 Citronska kislina ($C_6H_6O_6$)

Citronska kislina prehaja iz grozdne jagode v mošt, lahko pa nastaja pod vplivom plesni vrste *Botrytis cinerea*. V grozdni jagodi je citronska kislina redna spremljevalka jabolčne kisline, vendar je zaradi fiksacije na celično steno kože veliko ostane v tropinah (Bavčar, 2009; Šikovec, 1993). Pri predelavi preide v vino, v katerem je stabilna, neobstoja postane ob delovanju MKB. Citronska kislina se uporablja tudi za dokisanje vina (Bavčar, 2009). Vino jo v povprečju vsebuje okoli 0,7 g/L, njene koncentracije so višje v moštih iz grozdja slabše kakovosti (Šikovec, 1993).

2.1.3.5 Ocetna kislina (C_2H_4O)

Ocetna kislina je v vinu ena pomembnejših hlapnih kislin. V običajnih količinah ima v vinu pomembno vlogo kot aromatična spojina in pri tvorbi estrov. Nastane že tekom alkoholne fermentacije s pomočjo kvasovk. Njene povečane koncentracije, nad 0,8 g/L, so posledica delovanja škodljivih mikroorganizmov, predvsem očetnokislinskih bakterij. Lahko se tvori tudi s kemijsko hidrolizo hemiceluloze med zorenjem vina v lesenih posodah. V novih sodih tako nastane do 0,2 g/L več očetne kisline (Bavčar, 2009).

2.1.3.6 Ostale kisline v moštu in vinu

V vinu najdemo še fumarno, piruvično in α -ketoglutarano kislino, katere so prisotne v majhnih količinah (nekaj 10 do nekaj 100 mg/L). Nastajajo iz sladkorjev, aminokislin ali maščobnih kislin tekom alkoholne fermentacije. Na titrabilno kislost in pH vrednost vplivajo v majhni meri (Bavčar, 2009).

Poleg že omenjenih kislin v moštu in vinu poznamo še jantarno kislino, ki je produkt kvasovk in je v anaerobnih razmerah mlečnokislinske bakterije ne vključijo v svoj metabolizem. V vinu je zelo stabilna in prisotna v koncentracijah 0,2-2 g/L (Jackson, 2008). Piruvične kisline lahko vino vsebuje do 0,3 g/L. Mravljinčna kislina se nahaja v zelo nizkih koncentracijah. Glukonska kislina je produkt plesni in očetnokislinskih bakterij ter je v vinu prisotna do 1,1 g/L (Fleet, 2002).

2.1.4 Mineralne snovi

Na koncentracijo mineralov v moštu vpliva več dejavnikov, kot so vremenske razmere, sorta, stopnja zrelosti grozdja, sestava tal, gnojenje ter način predelave. V moštu je vsebnost mineralov 3-4 g/L, v vinu pa 1,8-2,5 g/L (Radovanović, 1986).

Pomembne mineralne snovi mošta in vina so kalij, magnezij, kalcij in natrij ter karbonati, sulfati, fosfati in kloridi. Na količino mineralnih snovi vplivajo dejavniki, kot so geoklimatske razmere, agrotehnični ukrepi, sorta in stopnja zrelosti (Würdig in Woller, 1989).

2.1.5 Dušikove spojine

Dušikove spojine grozdja pomembno vplivajo na pridelano vino. Kvasovke jih porabljajo pri izgradnji lastnih strukturnih in funkcionalnih beljakovin, posledično se kvasna biomasa poveča ter pri sintezi encimov, kateri so pomembni za nemoten potek alkoholne fermentacije. Njihovo pomanjkanje v moštu vodi do upočasnjene ali celo prekinjene AF. Pomembno vplivajo tudi na tvorbo aromatičnih snovi v vinu, te so lahko pozitivne (nekateri višji alkoholi), ali negativne (H_2S) (Košmerl, 2007). Vsebnost dušikovih spojin se tekom dozorevanja grozdja zvišuje. Korenine vinske trte lahko dušik sprejmejo v obliki nitrata, ki se s pomočjo encima nitratna reduktaza pretvori v amonijak, shranjuje pa se v obliki aminokislin (Bavčar, 2009). Vsebnost skupnega dušika v moštu je med 60 in 2400 mg/L (Henschke in Jiranek, 1992).

Anorganskih dušikovih spojin (kot so amonijak in amonijeve spojine) je v vinu do 300 mg/L (Bavčar, 2009). Kvasovke jih izkoriščajo pri izgradnji lastnih beljakovin, pri tvorbi biomase in encimov, kateri so pomembni za nemoten potek alkoholne fermentacije. Odločilno vplivajo na kemijsko in senzorično kakovost vin (Milek, 2001).

Beljakovine, katere razvrščamo na termolabilne albumine in termostabilne globuline, so v organskih dušikovih spojinah zastopane v 60 do 80 %. Kvasovkam predstavljajo vir dušika le v obliki aminokislin. Na koncentracijo posamezne aminokisline v moštu imajo pomemben vpliv sorta, klima, stopnja dozorelosti grozdja, gnojenje, tehnologija predelave ter morebitna okužba s plesnijo vrste *Botrytis cinerea*. Rast kvasovk, potek alkoholne fermentacije in tvorba aromatičnih snovi v vinu so močno odvisne od same aminokislinske sestave mošta (Taks, 2000).

2.1.6 Pektinske snovi

Količina pektinskih snovi v moštu je odvisna od stopnje zrelosti grozdja, sorte, zdravstvenega stanja grozdja ter njegovih mehanskih poškodb (Garoglio, 1981). Prištevamo jih med polimere galakturonske kisline, ki jih povezuje α -1,4-glikozidna vez (Ribéreau-Gayon, 2000b). Pektinske molekule, katere so zaestrene z metanolom, so topne, povsem proste molekule pa so netopne. Vinu onemogočajo samobistrenje, tekom alkoholne fermentacije se hidrolizirajo, zato se zviša vsebnost metanola v vinu (Šikovec, 1993).

2.1.7 Fenolne spojine

Fenoli preidejo v vino z grozdom, v majhnih količinah pa se lahko ekstrahirajo iz lesene posode tekom zorenja vina. Prištevamo jih med benzenove spojine, ki imajo eno ali več hidroksilnih skupin in jih uvrščamo med flavonoidne in ne flavonoidne snovi. Pomembno vplivajo na barvo in stabilnost vina, vendar v večjih količinah povzročajo trpek in grenek

okus. Prisotnost kisika povzroči hitro oksidacijo fenolnih spojin in s tem porjavitev vina (Bavčar, 2009; Košmerl in Kač, 2007).

2.2 ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Fermentacija grozdnega soka v vino je kompleksen mikrobiološki proces, ki obsega postopen razvoj in interakcije med različnimi mikroorganizmi, kot so kvasovke, bakterije in nitaste glive (Pretorius, 2002). Pri reakcijah alkoholne fermentacije imajo ključno in najpomembnejšo vlogo vinske kvasovke (Fleet in Heard, 1992), saj imajo sposobnost pretvorbe sladkorjev grozdja v etanol in ogljikov dioksid ter v ostale pomembne metabolite v manjših koncentracijah (Pretorius, 2002).

Glukoza je tisti sladkor, katerega kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* uporabljajo kot glavni vir energije med procesom, imenovanim glikoliza, pri kateri se tvorijo stranski produkti v obliki energije ATP in različnih intermediantov. Poznamo dva metabolna procesa (Košmerl, 2007):

- aerobni proces – dihanje ali respiracija: nastajanje biomase; pri tem procesu gre za popolno oksidacijo;
reakcija: $\text{glukoza} + 6 \text{ O}_2 \rightarrow 6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} + 36 \text{ ATP} + \text{toplota}$, ... (2)
- anaerobni proces – vrenje ali fermentacija: nastajanje etanola; pri tem procesu je acetaldehid končni akceptor elektronov;
reakcija: $\text{glukoza} \rightarrow 2 \text{ etanol} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ ATP} + \text{toplota}$ (3)

Energetski učinek sta le dve molekuli ATP na molekulo glukoze. Kljub temu, da so kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* sposobne energetsko učinkovitejšega respiratornega ali dihalnega metabolizma, v medijih z veliko koncentracijo sladkorjev fermentirajo, saj so podvržene represiji z glukozo (Crabtree efekt). V alkoholni fermentaciji se pretvori v energijsko bogat ATP le 6 do 8 % energije, medtem ko je mnogo ostane vezane v etanolu (Povhe-Jemec, 2003).

Količina nastalega etanola, proizvedenega na enoto porabljenega sladkorja med fermentacijo, predstavlja po teoretičnih izračunih 51,1 %. Teoretično se tako 180 g sladkorja pretvori v 88 g CO₂ in 92 g etanola. Vendar je praktični izkoristek alkoholne fermentacije le 47 %, saj se 95 % sladkorja pretvori v etanol, 1 % sladkorja se porabi za izgradnjo celičnega materiala, 4 % sladkorja se pretvori v druge končne produkte (metabolite), nekaj alkohola pa se z izhlapevanjem izgubi v atmosfero. Običajne vsebnosti alkohola v vinu so od 8,5-14 vol.% (Košmerl, 2007). Etanol, kot glavni produkt AF deluje zaviralno ravno na kvasovke, katere ga proizvajajo. Zaradi prostega prehajanja skozi membrano, poškoduje številne celične organele kvasovk, posledično se povečata prepustnost membrane ter prehod protonov v kvasno celico (Berthels in sod., 2004).

Na glavne hlapne spojine, ki se tvorijo tekom alkoholne fermentacije, vplivajo sestava mošta, fermentacijske razmere med samim procesom ter sev kvasovk, ki ga inokuliramo

(Patel in Shibamoto, 2002). Kadar inokuliramo isti sev kvasovk v mošte različnih sort, lahko pričakujemo razlike v hlapnih spojinah. S sortno aromo imujemo aromatične spojine, ki v vino pridejo z grozdom, tistim, ki pa se tvorijo med AF, pravimo fermentacijske arome. Med slednje prištevamo višje alkohole, maščobne kisline, acetate, etilne estre, ketone in aldehide (Romano in sod., 2003).

Poleg alkoholne fermentacije imajo na končno kakovost vina pomemben vpliv tudi drugi dejavniki, med katere prištevamo kakovost grozdja, ekstrakcijo grozdnega soka, stekleničenje ter zorenje vina (Košmerl, 2013).

Danes so navadno v uporabi selekcionirani sevi vinskih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, katere so sposobne hitre, učinkovite in predvidljive alkoholne fermentacije. Njihova prednost je predvsem v skladnosti vonja in okusa ter v hitri in popolni pretvorbi sladkorjev v alkohol. Uporaba selekcioniranih kvasovk pa ne prepreči vedno metabolne aktivnosti kvasovk rodov ne-*Saccharomyce* ter na vinsko klet vezanih sevov vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2002).

2.2.1 Grozdna mikrobiota

Mikroorganizmi prehajajo na površino grozdnih jagod s pomočjo vetra, z dežnimi kapljicami, z žuželkami ali pa neposredno iz vinogradniških tal. Ti se zelo hitro razmnožujejo na poškodovanih ali odpadlih zrelih jagodah, saj imajo na voljo dovolj hranil in zraka, med trgatvijo v jesenskem času pa tudi višjo, njim ugodnejšo temperaturo (Šikovec, 1993). Temperaturne razlike, količina padavin, stopnja zrelosti, pesticidi, morebitne poškodbe grozdnih jagod ter sorta so dejavniki, ki vplivajo na številčnost grozdne mikrobiote (Košmerl, 2003).

Na grozdnih jagodah je populacija zelo raznovrstna. Na sestavo mikrobiote mošta ne vpliva le prisotna mikrobiota na grozdu, temveč tudi tista s predelovalnih strojev. Fizikalno-kemijski dejavniki, ki vplivajo na mikrobioto mošta so: vrednost pH, temperatura, prisotnost kisika, hranil ter inhibitorjev (Košmerl, 2003).

2.2.1.1 Bakterije

Bakterije z grozdnih jagod med predelavo prehajajo v mošt. V vinu je poznanih relativno majhno število rodov bakterij, kar posledično prištevamo k nastajanju kislin in etanola med alkoholno fermentacijo. Bakterije najoptimalneje rastejo v rahlo alkalnem ali nevtralnem okolju, zato na njihovo rast v večji meri močnejše vpliva nižja vrednost pH kakor pa etanol. Delimo jih na dve vrsti, in sicer na škodljive ter vinu koristne bakterije (Šikovec, 1993).

V vinarstvu sta poznani dve različni vlogi mlečnokislinskih bakterij, in sicer pozitivna je potek jabolčno-mlečnokislinske fermentacije ter negativno, ki je vzrok mnogih bolezni. (Šikovec, 1993). Razdelimo jih na homo- in heterofermentativne. Med potekom fermentacije se odstotek posamezne vrste bakterij lahko spreminja zaradi okuženosti

grozdja in kleti. Tudi kislost je eden izmed dejavnikov, saj ta močno vpliva tako na rast, kot na preživelost bakterij. Tvorba mlečne in očetne kisline iz sladkorjev je posledica delovanja heterofermentativnih bakterij. Do razgradnje jabolčne kisline v mlečno pride v poznejših fazah fermentacije, ko v ospredje stopi bakterija vrste *Oenococcus oeni* (Kastelec, 2001).

Do kvara vina pride zaradi preživetja očetnokislinskih bakterij tekom alkoholne fermentacije, to privede do razmnoževanja ob ugodnih razmerah ter posledično do tvorbe očetne kisline (Kastelec, 2001). Ločevanje poškodovanega grozdja od zdravega in kratek čas od trgatve do predelave (ob pomoči bistrenja in dodatka SO₂) sta postopka, s katerima preprečujemo kvar vina (Šikovec, 1993).

2.2.1.2 Plesni

Populacija plesni v vinu je raznolika, prevladujoči rodovi so *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* in *Botrytis* (Boulton in sod., 1996). Plesen vrste *Botrytis cinerea* se navdno pojavi ob okužbi nedozorelega grozdja vedno kot kvarljivcev, ki močno zmanjša kakovostno in količinsko dobrobit vina. Zaradi bogatega encimskega kompleksa, ki ga ta rod plesni premore, predvsem pektinaz in celulaž, se razgradijo pektini in celuloza grozdne kožice. Ta učinek pospešijo visoka relativna vlažnost, nižje temperature in majhen delež sladkorja v grozdnih jagodah. V gnilem grozdju so povečane vsebnosti oksidacijskega encima lakaze, ki ga proizvaja botritis. Prav zato so mošti iz gnilega grozdja podvrženi hitri oksidaciji, zlasti fenolnih snovi. Zato je potrebno nagnito grozdje zavarovati pred škodljivim encimskim delovanjem in razvojem kvarljivcev (zlasti očetno- in mlečnokislinskih bakterij ter »šibko-vrelnih« kvasovk) z žveplanjem (Šikovec, 1993).

2.2.1.3 Kvasovke

Glede na vpliv kvasovk na kakovost vina, poznamo koristne ali žlahtne kvasovke z močno vrelo sposobnostjo ter nežlahtne ali divje kvasovke s šibko vrelo sposobnostjo. Močno-vrelne kvasovke spadajo v rod *Saccharomyces*, od katerih pa opazimo le posamezne seve, ki lahko pretvorijo največ do 18 vol.% alkohola. Pomembne so zaradi hitrega začetka alkoholne fermentacije, katera poteka enakomerno in ne preburno. Tvorijo manjše vsebnosti hlapnih kislin kot ostale kvasovke in hkrati ne pride do prevelikih tvorb količine žveplovodika, aromo vinu pa zvišujejo tudi njeni sekundarni produkti. Kvasovke, ki imajo nizko vrelo sposobnost povretja sladkorja, najdemo na površini grozdnih jagod. Zanje je značilno, da vedno pričnejo s spontano alkoholno fermentacijo. Po pretečenih petih dnevih AF in vsebnostih alkohola med več kot 3 in 4 vol.%, te prepustijo fermentacijo žlahtnim kvasovkam rodu *Saccharomyces*. V primeru neprisotnosti kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, šibko vrelne kvasovke povrejo sladkor le do polovice (Šikovec, 1993).

H kvasovkam kvarljivkam prištevamo oksidativne kvasovke ali tako imenovane kvasovke kana. Ker minimalno povrevajo sladkor, se posledično tvorijo nizke vsebnosti alkohola in

so zelo zahtevne glede potreb po kisiku. Sodelujejo že ob začetku alkoholne fermentacije, vendar ima alkohol, ki nastaja med procesom, nanje inhibotorni učinek. Imajo značilno žametasto rast, v obliki bele mreže na površinah posod, katere so nedolite. Če se le-te pojavijo, škodujejo kakovosti vina, ker povzročajo okus po kanu in taka vina delujejo oksidativno, posledično se lahko vsebnost etanola v vinu zmanjša. Vina, ki imajo višjo stopnjo alkohola, so odpornejša na kan, kar velja tudi za vina, skladiščena pri nižjih temperaturah (Šikovec, 1993).

2.3 VINSKE KVASOVKE IN NJIHOVA VLOGA MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO

2.3.1 Splošne značilnosti vinskih kvasovk

Kvasovke spadajo med evkariontske mikroorganizme, netaksonomsko skupino gliv, ki je definirana glede na njihove morfološke in fiziološke značilnosti. So filogenetsko različna skupina organizmov in pripadajo dvema glavnima taksonoma, in sicer *Ascomycotina* in *Basidiomycotina*. Brstenje je praviloma nespolno razmnoževanje kvasovk, nekatere pa se razmnožujejo s pomočjo cepitve. Številni sladkorji nastajajo v aerobnih pogojih, medtem ko ima le nekaj vrst kvasovk sposobnost alkoholne fermentacije v anaerobnih razmerah (Raspor, 1996).

Kadar je prisotnih več mikrobnih interakcij, ki vključujejo različne in številne mikroorganizme, od katerih imajo ravno kvasovke najpomembnejšo vlogo, govorimo o spontani alkoholni fermentaciji. Izvor kvasovk, ki sodelujejo pri spontani alkoholni fermentaciji, najdemo na vinski posodi ali pa so prisotne na samih grozdnih jagodah. Skupina, v katero uvrščamo vinske kvasovke, je sestavljena iz 18-ih rodov. Površina grozdne jagode in kletarska oprema sta področji, kjer se divje kvasovke nahajajo v velikem številu. To so ne-*Saccharomyces* kvasovke, med katere uvrščamo rodove *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, idr. (Košmerl, 2013).

Dejavniki, kateri vplivajo na rast kvasovk tekom alkoholne fermentacije so dodane startne kulture, temperatura fermentacije, žveplanje, stopnja bistrosti mošta, njegova fizikalno-kemijska sestava, ostanek zaščitnih sredstev in vpliv ostalih mikroorganizmov (plesni in bakterije) (Košmerl, 2007).

2.3.2 Vinske kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae* spada v skupino *Ascomycetes*. Ta skupina ima več kot 2000 rodov. Nekateri rodovi živijo v zelo vlažnem oziroma vodnem okolju, drugi pa parazitirajo na rastlinah. Razmnožuje se s sporami (askosporami), ki so v askusih (1-4, ovalne oblike), vendar je ta način razmnoževanja industrijsko nezanimiv. Pomembnejše so

vegetativne vrste razmnoževanja. Največ se razmnožujejo z brstenjem, za *Saccharomyces cerevisiae* je značilno multipolarno. V idealnih pogojih ciklus traja dve uri. Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so ovalne oblike, na trdih gojiščih so kolonije krem barve, s hrapavo površino in narezljanim robom. Asimilirajo dušikove spojine v obliki amonijaka. Rastni pogoji niso zahtevni, saj rastejo do a_w vrednosti 0,90, optimalni pH za rast je med 6 in 7, optimalna temperatura za rast pa je 28 °C, oziroma za fermentacijo med 32 in 35 °C. Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so Crabtree pozitivne (Pretorius, 2002; Košmerl, 2013).

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je znana kot »vinska kvasovka« v pravem pomenu besede (*stricto sensu*). Znano je tudi, da z različnimi sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* pridelamo po kakovosti zelo različna vina. Čeprav je ta vrsta prevladujoča na koncu sleherne alkoholne fermentacije, pa je na površini grozdne jagode in v moštu prisotna le v zelo majhnem številu (Košmerl, 2007). Senzorične lastnosti vin, ki so pridelana z dodatkom startskih kultur kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, se močno razlikujejo od tistih, ki nastanejo pri alkoholni fermentaciji z avtohtono populacijo kvasovk. Različni sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* lahko izoblikujejo različne aromatične lastnosti vina pri fermentaciji istega mošta. Razlog za to so različne sposobnosti sevov kvasovk pri sproščanju sortnih hlapnih spojin iz prekurzorjev v grozdju in pri tvorbi novih hlapnih spojin (Fleet, 2003).

2.3.3 Dodatek startske kulture vinskih kvasovk

V zadnjih letih je bilo dokazano, da ni nujno, da dodan sev kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* prevladuje tudi ob koncu fermentacije. Z dodajanjem velike količine inokuluma kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, popolnoma ne zatremo rasti avtohtonih kvasovk rodov ne-*Saccharomyces*. Te zaradi svoje specifične biokemijske aktivnosti, ki s svojim razmnoževanjem in metabolno aktivnostjo vplivajo tako na samo kemijsko sestavo vina, kot verjetno tudi na kasnejšo rast in metabolizem kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. V prvih dneh fermentacije njihov metabolizem vpliva tudi na tvorbo hlapnih snovi. Tako npr. kvasovke vrste *Torulaspora delbrueckii* tvorijo majhne koncentracije očetne kisline, etil acetata in acetaldehida, medtem ko kultura kvasovk vrste *Candida stellata* tvori večje koncentracije glicerola (Košmerl, 2007).

V modernih vinskih kletah se večinoma uporablja selekcionirane seve kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki so jamstvo za hitro, učinkovito in predvidljivo fermentacijo. Te dajejo skladnost okusa in vonja po zaključeni fermentaciji. Inokulum se dodaja v mošt po bistrenju in/ali žveplanju, da se zmanjša ali zavre delovanje avtohtone mikrobioe. Selekcioniran sev omogoča hitro in popolno pretvorbo sladkorjev v etanol v veliko krajšem času. Opaziti je manj razlik med vini različnih letnikov in večjo skladnost v senzoričnih lastnostih določenega vina v okviru geografskega področja. Naravno prisotna mikrobna

združba vinograda in vinske kleti vpliva tako na spontano kot na vodeno alkoholno fermentacijo (Pretorius, 2002).

Preglednica 1 prikazuje najpomembnejše cilje selekcije kvasovk. Spontano alkoholno fermentacijo okarakteriziramo s prisotnostjo različnih vrst ter sevov vinskih kvasovk. Mešana avtohtona populacija lahko mošt fermentira v vino, ki je polno, harmonično ter izrazito sadnega značaja. Dodatek kulture vinskih kvasovk je zato priporočljiv, da ne pride do težav spontane alkoholne fermentacije, med katere uvrščamo povečano vsebnost očetne kisline ter njenih estrov, razne priokuse, upočasnitev ali celo zaustavitev AF (Košmerl, 2007).

Preglednica 1: Osnovni selekcijski kriteriji vinskih kvasovk in cilji selekcije (Košmerl, 2007)

Selekcijski kriteriji	Cilji selekcije
fermentacijska sposobnost	majhna tvorba sulfida in sulfid vezujočih substanc
osmotoleranca	čim manjša tvorba hlapnih kislin in H ₂ S
odpornost na alkohol	majhna sposobnost penjenja
odpornost na sulfit	sposobnost tvorbe filma (sherry)

Izbira primerne seve kvasovk je torej lahko odločilnega pomena pri razvoju zelenega karakterja vina. Danes je tržno dostopnih mnogo različnih sevov startskih kultur kvasovk, kar omogoča pridelovalcem vina večji izbor in s tem izbiro primerne seve za pridelavo vina z zelenimi senzoričnimi lastnostmi (Molina in sod., 2009).

2.3.4 Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk

V preglednici 2 so prikazane najbolj osnovne zelene in nezelene lastnosti vinskih kvasovk, bodisi avtohtonih bodisi selekcioniranih sevov. Verjetno je jasno, da je vse te številne zelene lastnosti skoraj nemogoče popolnoma zagotoviti. Zato se je že pred leti porodila ideja uporabe mešane kulture različnih sevov kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, od katerih ima posamezni sev zelo različno razmerje končnih sekundarnih produktov. Tako pridelano vino je vsekakor bistveno bolj kompleksno s stališča hlapnih aromatičnih sestavin; predvsem 3-metil-butil acetata (Košmerl, 2007).

Preglednica 2: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk (Košmerl, 2007)

Želene lastnosti	Neželene lastnosti
visoka odpornost na etanol	tvorba žveplovega dioksida
poraba sladkorja v celoti	tvorba vodikovega sulfida
odpornost na žveplov dioksid	tvorba hlapnih kislin
fermentacija pri nizkih temperaturah	tvorba acetaldehida in piruvata
minimalna faza prilagajanja	sposobnost penjenja
razgradnja jabolčne kisline	tvorba prekurzorjev etil karbamata
fermentacija pod tlakom	aktivnost polifenoloksidaz
tvorba glicerola	
aktivnost β -glukozidaze	
zimocidna (killer) aktivnost	

2.3.5 Fizikalno-kemijske razmere med alkoholno fermentacijo

Na začetku procesa je razpoložljivost hranil največja in upada proti koncu, ko se jih večina porabi. Kvasovke pri takšni obliki fermentacije rastejo po krivulji, ki jo razdelimo na štiri faze rasti, to so (Bavčar, 2009):

- »lag« (faza prilagajanja),
- »log« (eksponentna faza rasti),
- stacionarna faza (razpoložljivost hranil upada istočasno pa narašča koncentracija toksičnih snovi),
- faza odmrtja (na koncu se količina hranilnih snovi še zmanjša, toksičnost snovi pa poveča; tako je število odmrlih celic večje kot število novih celic).

V odvisnosti od seva kvasovk rodu *Saccharomyces* obstajajo velike razlike v kinetiki porabe sladkorja (glukoze ali fruktoze) zlasti proti koncu fermentacije, ko so celice v pozni stacionarni fazi. Poznani so tudi vplivi sorte, letnika in stopnje zrelosti grozdja na kinetiko alkoholne fermentacije in maksimalno tvorbo ogljikovega dioksida (Košmerl, 2007). Proti koncu alkoholne fermentacije je razgradnja sladkorjev inhibirana zaradi velike koncentracije nastalega etanola in sicer je razgradnja fruktoze bolj inhibirana v primerjavi z razgradnjo glukoze, predvsem zaradi prisotnih višjih alkoholov (Berthels in sod., 2004).

2.4 STARTRSKKE KULTURE VINSKIH KVASOVK

2.4.1 Osnovne lastnosti starttrskih kultur vinskih kvasovk

Za fermentacijo mošta uporabljajo vinarji različne komercialne startrske kulture, katere so selekcionirane po štirih kriterijih, kot so fermentacijska lastost, senzorična značilnost ter tehnološka in metabolna lastnost. Kljub temu se v praksi srečujejo z vsaj eno od težav, med katere uvrščamo nezadostno pretvorbo sladkorjev v etanol, ovirano asimilacijo dušikovih spojin, slabšo odpornost na etanol ter tvorbo pene.

Da zagotovimo celotno pretvorbo sladkorja, brez tvorbe neželenih spojin, je potrebno zagotoviti prevlado kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* z zagotovitvijo anaerobnih razmer, z optimalno fermentacijsko temperaturo med 16 in 20 °C ter z dodatkom startrske kulture v gostoti $1\text{-}5\cdot 10^6$ CFU/mL.

2.4.2 Zahteve za industrijsko produkcijo startrskih kultur

Pri pripravi zdrave startrske kulture, je za rehidracijo kvasovk potrebno slediti navodilom proizvajalca. Inokulum mora vsebovati vsaj 2-5 milijonov aktivnih kvasnih celic v 1 mL, kar odgovarja 1-3 vol.% inokuluma. Dodatek suhih kvasovk je potreben med 15 in 40 g/hL, odvisno od samega mošta. V primeru slabšega zdravstvenega stanja grozdja (gnilobe), je potreben večji inokulum, in sicer med 20 in 40 g/hL mošta. V belih moštih iz zdravega grozdja in po opravljenem bistrenju je običajni dodatek inokuluma 15-25 g/hL. Voda, v kateri rehidriramo startrsko kulturo kvasovk, mora imeti temperaturo med 35 in 40°C in ne sme biti klorirana. V prvi fazi rehidracije v vodo ne dodajamo sladkorja ali mošta, saj bi osmotski stres povzročil le manjšo preživelost kvasne populacije. Zmes previdno premešamo in pustimo nabrekati 20-30 minut. Prvi stres za kvasovke predstavlja rehidracija in inokulacija startrske kulture, ki sta povezani s hiperosmotskim šokom. Po adaptaciji celic na novo okolje (mošt) sledijo stresne razmere, vezane na samo fermentacijo. Med te stresne dejavnike prištevamo omejeno količino hranilnih snovi, neravnotežje med ogljikovimi hidrati in dušikom, pomanjkanje molekularnega kisika, toksičnost etanola in maščobnih kislin ter temperaturne spremembe (Košmerl, 2007).

2.5 JABOLČNO-MLEČNOKISLINSKA FERMENTACIJA (MLF)

Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija (MLF) ali biološki ali mlečnokislinski razkis (tudi malolaktična fermentacija) je takoj za alkoholno fermentacijo drugi najbolj znan mikrobiološki proces v vinu. V osnovi gre za pretvorbo jabolčne kisline v milejšo mlečno kislino in ogljikov dioksid pod vplivom delovanja mlečnokislinskih bakterij (Bavčar, 2009).

Proces MLF je dobro raziskan in njegov glavni namen je zmanjšanje koncentracije kislin in značilna sprememba vonja ter okusa (Bartowsky in sod., 2010). MLF lahko poteče spontano z avtohtonimi mlečnokislinskimi bakterijami, katerih izvor predstavljajo grozdje in kletarska oprema ali pa je spodbujena z inokulacijo izbranih bakterijskih startrskih kultur, ki so komercialno dostopne kot liofilizirane mlečnokislinske bakterije (Zapparoli in sod., 2008).

MLF vpliva na tri različne, vendar med seboj povezane vidike kakovosti vina. To so kislost, mikrobiološka stabilnost in zaznava kompleksnosti vina (Knoll in sod., 2010).

2.5.1 Mlečnokislinske bakterije (MKB)

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so grampozitivne bakterije. Njihov primarni produkt metabolizma glukoze je mlečna kislina. Delimo jih na homofermentativne, ki tvorijo več kot 85 % mlečne kisline ter heterofermentativne, katere poleg mlečne kisline tvorijo še etanol, ogljikov dioksid ter ocetno kislino (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a). Pomembnejše so slednje, med katere spada tudi najpomembnejša vrsta *Oenococcus oeni* (Bavčar, 2009). Pred in med alkoholno fermentacijo večinoma mirujejo, šele ko je vrenje končano, v zanje ugodnih razmerah pričnejo svoje delovanje (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999).

Številne vrste mlečnokislinskih bakterij so sposobne vodenja MLF, vendar je vrsta *Oenococcus oeni* med njimi najpomembnejša, saj je odporna na velike koncentracije skupnih kislin in etanola ter je prilagojena na majhno vsebnost hranilnih snovi v vinu. MKB rodov *Lactobacillus* in *Pediococcus* so sicer sposobne MLF, vendar ponavadi povzročijo kvar vina (Bartowsky in sod., 2010).

Med MLF se zaradi metabolizma mlečnokislinskih bakterij vrste *Oenococcus oeni* spreminja kemijska sestava vina, kar pomeni spremembe v videzu, vonju in okusu vina. Ta vrsta je sposobna v svoj metabolizem vključiti večino kemijskih spojin, katere so prisotne v vinu, vključno z ogljikovimi hidrati, polioli, beljakovinami, aminokislinami, fenoli, organskimi kislinami in glikozidi. Med rastjo in metabolizmom MKB pa v vinu nastajajo tudi številni sekundarni metaboliti, od katerih mnogi vplivajo na aromo in okus vina (Bartowsky in sod., 2010).

2.5.2 Mlečnokislinske bakterije vrste *Oenococcus oeni*

MKB vrste *Oenococcus oeni* so gram pozitivni negibljivi koki, nesporogeni, elipsoidne do kroglaste oblike ter se navadno pojavljajo v parih ali verižicah. So acidofilne bakterije, saj jim ustreza medij s pH nižjim od 4,8, celo do 3,0. Uspevajo tudi v prisotnosti 10 vol.% etanola. Rast v gojišču je počasna in navadno konstantna. Najbolje uspevajo pri temperaturah od 20 do 30 °C, optimalna temperatura pa je 22 °C, medtem ko je pri temperaturah, nižjih od 15 °C, rast upočasnjena. Zahtevajo prehransko bogat medij s kompleksnimi rastnimi dejavniki in aminokislinami. Določeni sevi izkoriščajo tudi citrat, vendar samo v prisotnosti fermentabilnih sladkorjev (Vrščaj Vodošek, 2007).

2.5.3 Vloga jabolčno-mlečnokislinske fermentacije

Glavni namen MLF, ki jo velika večina pozna pod imenom biološki razkis, je zmanjšanje koncentracije skupnih kislin in uravnavanje pH na želeno vrednost. Biološki razkis značilno vpliva na spremembo vonja in okusa (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a). Za mlečnokislinski razkis se priporočajo temperature med 16 in 20 °C. Pri temperaturah nad 20 °C se pospeši, pod 15 °C se jabolčna kislina porablja zelo počasi, pod 10 °C pa se dekarboksilacija prekine (Bavčar, 2009).

V vinu, ki vsebuje več kot 4 g nepovretega sladkorja na liter, slednjega razgradijo, tako nastane mlečna kislina in cela vrsta večinoma neželenih stranskih produktov, npr. očetna kislina in diacetil. Če v vinu ni ostanka nepovretega sladkorja (pod 4 g/L), bakterije spreminjajo jabolčno kislino v mlečno kislino in CO₂. Tako se skupna kislina v vinu znižuje po biološki poti (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999). Na sam potek MLF in razvoj MKB vplivajo številni dejavniki, ki jih delimo v tri skupine: fizikalni, kemijski in biološki. Med fizikalnimi dejavniki je odločujoča temperatura, med kemijskimi dejavniki pa lahko izpostavimo pH, etanol in SO₂. Skupina bioloških dejavnikov zajema interakcije kvasovk, bakterij in bakteriofagov z MKB (Vrščaj Vodošek, 2007).

2.5.4 Vpliv jabolčno-mlečnokislinske fermentacije na vino

Kislina in pH

Koncentracija skupnih kislin se zmanjša in posledično se dvigne pH. To je koristno za vina z visokimi kislinami in nizkim pH (npr. teran), v nasprotnem primeru pa lahko povzroči tudi nezaželene spremembe. Posledica spremembe pH je tudi delna izguba barve rdečih vin zaradi sprememb na antocianih in včasih sprememba tona barve v bolj modro-vijolične odtenke (Bavčar, 2009).

Spremembe vonja in okusa

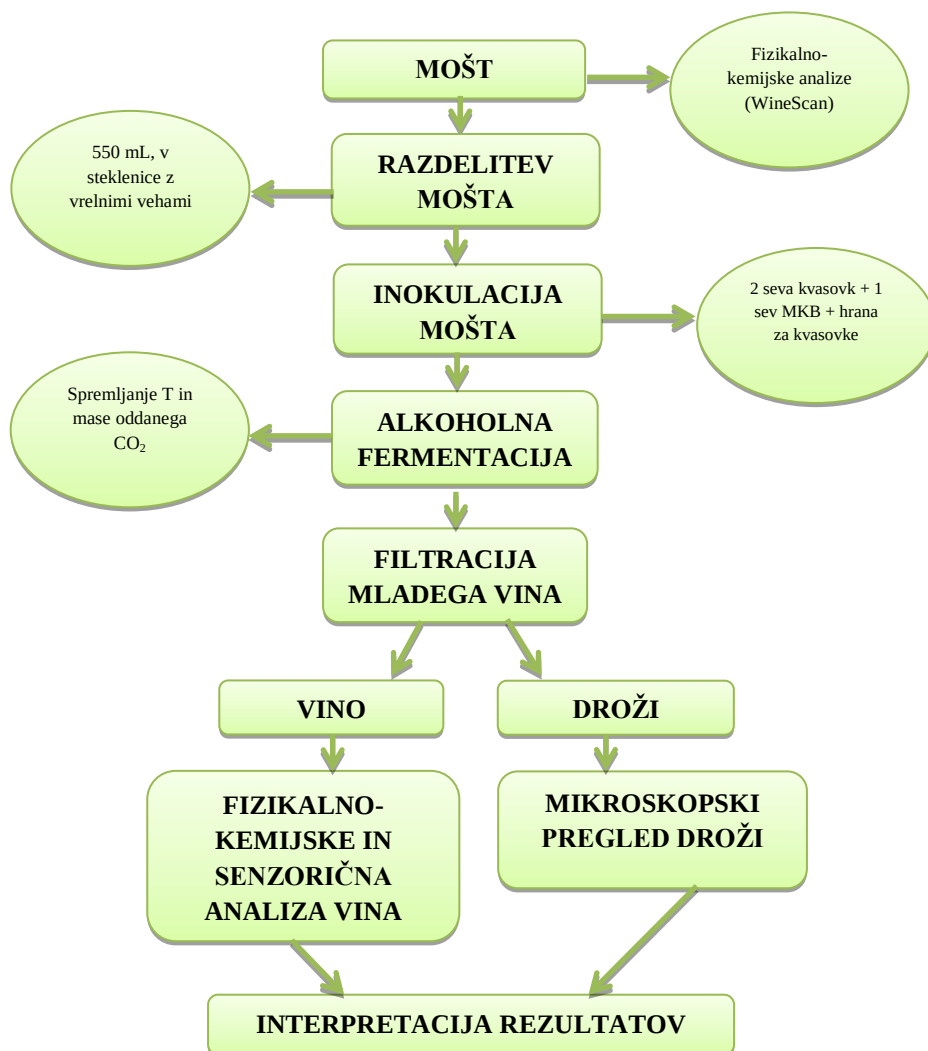
Vinarji uporabljajo jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo predvsem za dosego zelene senzorične kakovosti vina. Kompleksnost arome, polnost in zaokroženost okusa ter kislinsko ravnotežje so najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na zelene senzorične parametre (Muhar in Košmerl, 2005). Okus vina se opazno spremeni, ker se jabolčna kislina, ki deluje ostro, sveže, rezko in nezrelo, spremeni v milejšo mlečno kislino. Ta deluje bolj mehko, uglajeno in zrelo. K večji polnosti okusa vsaj delno prispevajo tudi druge spojine, kot sta etil laktat in diacetil (Bavčar, 2009).

Mikrobiološka stabilnost

MLF splošno ugodno vpliva na mikrobiološko stabilnost, ker se zmanjša vsebnost hranilnih snovi za ostale mikroorganizme. Nastala mlečna kislina in preostala vinska kislina sta bolj stabilni, hkrati pa MKB porabijo večino vitaminov in aminokislin v vinu (Bavčar, 2009).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 ZASNOVA POSKUSA



Slika 1: Shematski prikaz poteka poskusa

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mošt

Uporabili smo mošt bele vinske sorte sauvignon, letnika 2015, iz vinorodne dežele Podravje, vinorodni okoliš Štajerska Slovenija. Po zaključeni alkoholni fermentaciji smo v moštu in pridelanih mladih vinih opravili fizikalno-kemijske analize. Potek poskusa je prikazan na sliki 1.

3.2.2 Startrske kulture

Pri fermentacijskem poskusu smo za inokulacijo uporabili dva seva osušenih selekcioniranih vinskih kvasovk, sev mlečnokislinskih bakterij in hranilo za kvasovke.

3.2.2.1 Kvasovke

- Lalvin ICV OKAY (Lallemand, 2012):
 - selekcionirana na ICV INRA and SupAgro Montpellier, Francija,
 - kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae*,
 - primerna za mlada, sveža in aromatična vina,
 - nastanek manjših koncentracij SO₂ in H₂S,
 - hitro dokončanje alkoholne fermentacije,
 - rezistenca na killer efekt.
- Uvaferm SLO (Lallemand, 2010):
 - selekcionirana na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, na Katedri za vinarstvo,
 - kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae*,
 - hitro razmnoževanje (6-8 ur), v pasteriziranem moštu doseže 5,5-5,8x10⁶ celic/mL,
 - najboljši rezultati pri vrenju belih moštov pri temperaturi 13-18°C,
 - rezistenca na killer efekt,
 - odporna na SO₂,
 - dobro izkoristijo sladkorno molekulo, 16,3-16,8 g sladkorja/L daje 1 vol.% alkohola,
 - prispevajo k zelo dobrim senzoričnim lastnostim (sadni aromi in polnosti) ter ohranjajo sortno cvetico.

3.2.2.2 Mlečnokislinske bakterije

- Lallemand OMEGA (Lallemand, 2012):
 - selekcionirana na inštitutu Français de la Vigne et du Vin, Francija,
 - mlečnokislinska bakterija vrste *Oenococcus oeni*,
 - odporne na visoke alkoholne stopnje (16 vol.%),

- odporne na nizek pH (3,1).

3.2.2.3 Hranilo za kvasovke

- RESKUE (Scott, 2010):
 - celične stene selekcioniranih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*,
 - za uporabo pri počasni alkoholni fermentaciji ali pri ponovnem zagonu le-te,
 - inhibira delovanje toksičnih snovi (pesticidov, nasičenih maščobnih kislin), ki bi negativno vplivale na sposobnost preživetja kvasovk in posledično na dokončanje alkoholne fermentacije.

V preglednici 3 so prikazane oznake vzorcev, katerim smo inokulirali posamezne startrske kulture oz. kombinacije le-teh in hranila za kvasovke ter količino njihovega dodatka (g/hL).

Preglednica 3: Uporabljeni dodatki komercialnih startrskih kultur in hranila

Oznaka vzorca	Komercialno ime dodatka (startrske kulture kvasovk, hranil, MKB)	Količina dodatka (g/hL)
1 in 8	brez dodatka*	/
2 in 9	Lalvin ICV OKAY	25
3 in 10	Lalvin ICV OKAY + RESKUE	25 + 40
4 in 11	Lalvin ICV OKAY + RESKUE + Lallemmand OMEGA	25 + 40 + 1
5 in 12	Uvaferm SLO	25
6 in 13	Uvaferm SLO + RESKUE	25 + 40
7 in 14	Uvaferm SLO + RESKUE + Lallemmand OMEGA	25 + 40 + 1

* Opomba: vzorca 1 in 8 nismo inokulirali s startrsko kulturo kvasovk in sta nam predstavljala kontrolo, s katero smo spremljali potek spontane AF.

3.3 METODE DELA

3.3.1 Postavitev fermentacijskega poskusa

V štirinajst vrelnih steklenic smo dodali po 550 mL mošta in ga inokulirali s predhodno rehidriranimi kvasovkami, mlečnokislinskimi bakterijami in hranilom, kot prikazuje Preglednica 3. Inokulum smo pripravili po navodilih proizvajalca. Poskus smo izvedli v dveh ponovitvah (vzorci 1-7 in 8-14). S pomočjo gumijastih zamaškov z vrelna veho smo zatesnili vrelna steklenice in jih pustili 24 ur pri sobni temperaturi (24 °C), da je lahko potekla faza aklimatizacije. Nato smo jih prenesli v komoro s temperaturo med 18 in 19 °C. Potek alkoholne fermentacije (AF) smo periodično spremljali gravimetrično s tehtanjem oddanega ogljikovega dioksida, na podlagi česar smo izrisali fermentacijske krivulje in krivulje kemijske kinetike skupno 14 fermentacij. Alkoholna fermentacija se je zaključila po 17-ih dneh.



Slika 2: Fermentacijske steklenice, napolnjene z moštom in priprava inokuluma (vrelnega nastavka)



Slika 3: Fermentacijske steklenice takoj po inokulaciji



Slika 4: Fermentacijske steklenice, 48 ur po inokulaciji

3.3.2 Fizikalno-kemijske analize mošta

3.3.2.1 Analiza osnovne kemijske sestave mošta z WineScanTM

WineScan analizo mošta in vina smo opravili na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica.

WSC analiza deluje na principu infrardeče spektroskopije, saj imajo fotoni infrardeče svetlobe energijo, primerno za vzbujanje nihanj vezi med atomi v posameznih molekulah. Le-ti nihajo na različne načine, ki so značilni za posamezen tip vezi, zato jih lahko uporabimo za kvalitativno in kvantitativno določitev komponent v vzorcu. Posamezni spektri molekul so zelo kompleksni in velja, da večja kot je molekula, večje je tudi število nihanj. Lega absorpcijskega vrha določene vezi je odvisna od okolice, v kateri se vez nahaja. Za ugotavljanje prisotnosti posameznih funkcionalnih skupin infrardeče spektre navadno snemamo v območju 400 cm^{-1} - 1600 cm^{-1} (Skvarč, 2007).

To metodo predvsem uporabljajo pri fizikalno-kemijskih analizah v živilstvu, vendar je zaradi časovno hitrih in natančnih meritev številnih parametrov, nepogrešljiva tudi v analitiki vina (Moreira in Santos, 2004).

Z analizo mošta WineScanTM smo določili naslednje parametre:

- relativno gostoto,
- sladkorno stopnjo,
- koncentracije skupnih titrabilnih kislin,
- koncentracije hlapnih kislin,
- koncentracije organskih kislin (vinska, citronska, mlečna),
- vrednost pH,
- vsebnost sladkorjev (glukoza, fruktoza)
- glicerol, idr.

S pomočjo analize WineScanTM lahko dobimo tudi podatek, kot je informativna vsebnost fenolnih spojin (FC indeks). Analiza ima prednost v nizkih stroških uporabljenih reagentov ter v nepotrebnih predhodnih termični ali kemijski obdelavi vzorcev (FOSS, 2014).

3.3.3 Fizikalno-kemijske analize vina

3.3.3.1 Analiza osnovne kemijske sestave vina z WineScanTM

Po končani alkoholni fermentaciji, smo ponovno izvedli analizo WSC na pridelanem mlademu vinu, kateremu smo določili naslednje parametre:

- relativno gostoto,
- vsebnost alkohola,
- vsebnost reducirajočih sladkorjev,
- koncentracijo skupnega suhega ekstrakta,
- koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta,

- koncentracije skupnih titrabilnih kislin,
- koncentracije hlapnih kislin,
- koncentracije organskih kislin (jabolčna, mlečna, vinska),
- vsebnost glicerola,
- vsebnost topnega CO₂.

3.3.3.2 Določanje fenolnih spojin v vinu

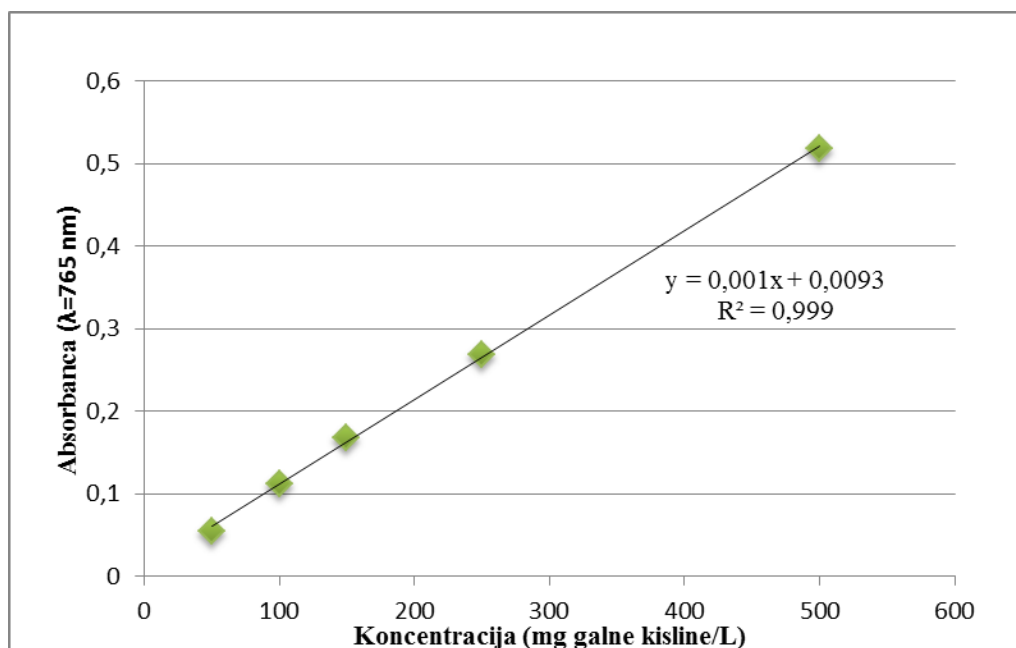
Fenolne spojine absorbirajo predvsem svetlobo UV ter vidnega spektra. Določili smo jih s spektrofotometrično metodo po Singletonu in Rossiju.

Za določitev vsebnosti skupnih fenolnih snovi smo vzorcu vina dodali Folin-Ciocalteujev reagent, kateri v alkalni raztopini, ob dodatku natrijevega karbonata, oksidira fenolne snovi v vinu. Vzorce smo pustili stati natanko dve uri, da je oksidacija fenolnih spojin lahko potekla. Po tem času smo izmerili absorbanco obarvane reakcijske zmesi z UV-VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 765 nm. Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo nato odčitali s pomočjo umeritvene krivulje, katero smo pripravili iz raztopine galne kisline. Z ustreznim redčenjem osnovne raztopine galne kisline smo pripravili standardne vzorce v koncentraciji od 50 do 500 mg/L, kot prikazuje preglednica 4. Koncentracijo fenolnih snovi smo podali v mg galne kisline v litru vina (Košmerl in Kač, 2007).

Preglednica 4: Standardne raztopine galne kisline (Košmerl in Kač, 2007)

Oznaka bučke	Volumen osnovne raztopine galne kisline (mL)	Končna koncentracija galne kisline v standardni raztopini (mg/L)
0	0	0 (slepi vzorec)
1	1	50
2	2	100
3	3	150
4	5	250
5	10	500

Standardne vzorce smo pripravili tako, da smo odpipetirali po 1 mL osnovne standardne raztopine v 100 mL merilno bučko. Dodali smo okoli 60 mL deionizirane vode, premešali in nato dodali še 5 mL Folin-Ciocalteujevega reagenta. Vsebino bučke smo ponovno premešali, po 30-ih sekundah smo ji dodali 15 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata, jo dopolnili z deionizirano vodo do oznake in še enkrat premešali. Pripravljene raztopine smo pustili stati pri sobni temperaturi natanko dve uri. Po pretečenem času smo vsebino prelili v 10 mm kivete in izmerili absorbanco pripravljenih standardnih raztopin proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 765 nm. Iz izmerjenih vrednosti standardov smo izrisali umeritveno krivuljo v odvisnosti absorbance od masne koncentracije galne kisline v mg/L. Vzorce vina smo pripravili po enakem postopku kakor standardno raztopino. Iz enačbe premice umeritvene krivulje smo nato izračunali koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcih vina (Košmerl in Kač, 2007).



Slika 5: Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin

3.3.3.3 Določanje antioksidativnega potenciala v vinu

Antioksidativni potencial (AOP) vina smo določili s pomočjo stabilnega prostega radikala DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) (Brand-Williams in sod., 1995), le-ta je modro obarvan reagent, ki reagira z donorji vodikovih protonov, v našem primeru so to polifenoli, ter pride do nastanka rumeno obarvanega DPPH₂. Uporabili smo tako metanolno raztopino radikala DPPH, ki ima pri valovni dolžini 517 nm absorbanco med 1,0 in 1,05. V vzorcih z večjo vsebnostjo fenolnih snovi, bo ob dodatku radikala le-teh zreagiralo več, posledica tega bo svetlejša barva in manjša absorbanca. Bolj kot se absorbanca znižuje, višji antioksidativni potencial ima vino (Podlogar, 2007).

Za analizo smo 50 µL vzorca vina dodali k 1,5 mL reagenta DPPH. Referenčne raztopine smo pripravili na enak način, le, da smo 1,5 mL raztopine reagenta DPPH zmešali z 50 µL metanola. Tako pripravljene vzorce smo dobro premešali in po točno 30-ih minutah izmerili absorbance pri valovni dolžini 517 nm. Nato smo izračunali razliko v absorbancah referenčne raztopine in vzorca. Dobljena vrednost je obratno sorazmerna AOP vina, saj bolj kot se absorbanca zmanjšuje, višji AOP vino ima. AOP smo izračunali iz poznane molarne ekstincijskega koeficienta DPPH (Molyneux, 2004), in smo ga izrazili kot množino reduciranega DPPH v litru vina (mmol/L) (Košmerl in sod., 2005).

Formule za izračun DPPH:

$$\Delta A = A_{standard} - (\bar{x} - A_{slepa}) \quad \dots(4)$$

$$DPPH \text{ (mol)} = \frac{\Delta A}{12000 \text{ (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times l \text{ (cm)}} \times V_{zmesi} \text{ (L)} \quad \dots(5)$$

$$DPPH \text{ (mol/L)} = \frac{DPPH \text{ (mol)}}{V_{\text{vzorca}} \text{ (}\mu\text{L)}} \times 100000 \text{ (}\mu\text{L/L)} \quad \dots(6)$$

Legenda:

A_{standard} – absorbanca standarda

$\bar{x}$ – povprečje izmerjenih absorbanc vzorca

A_{slepa} – absorbanca slepe probe

V_{zmesi} – volumen reakcijske zmesi

12000 – povprečna molarna absorptivnost (L/mol cm)

l – dolžina optične poti v kiveti

V_{vzorca} – volumen vzorca

1000000 – faktor za preračun mikrolitrov v litre

3.3.3.1 Izračun fermentacijske učinkovitosti

Formula za izračun fermentacijske učinkovitosti (Pretorius in sod., 2008):

$$FU = \frac{RS_m - RS_v}{ALK_{vol}} \quad \dots(7)$$

Legenda:

RS_m – sladkorna stopnja mošta (g/L)

RS_v – koncentracija reducirajočih sladkorjev (g/L)

ALK_{vol} – koncentracija alkohola (vol.%)

3.3.4 Mikrobiološke analize droži

3.3.4.1 Mikroskopski pregled droži

Po zaključeni alkoholni fermentaciji smo odvzeli usedlino oziroma droži, ki so ostale na dnu fermentacijske steklenice. Z mikroskopskim pregledom droži smo opazovali prisotno mikrobioto, ki je bila odgovorna za potek AF. S kapalko smo suspenzijo prenesli na objektno steklo in ga prekrili s krovnim. Pripravljen nativni preparat smo nato pregledalil s svetlobnim mikroskopom MOTIC BA 300 pri 400-kratni povečavi. S pomočjo računalniškega programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0 smo posneli digitalne fotografije mikrobne združbe droži.

3.3.5 Senzorične analize vina

Senzorična analiza je znanstvena disciplina o merjenju in vrednotenju lastnosti živil s čutili (Košmerl, 2005).

3.3.5.1 20-točkovna Buxbaumova metoda

Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina (Pravilnik o postopku..., 2000) določa, da poteka senzorično ocenjevanje vin po 20 točkovni metodi Bauxbaum, kjer ocenjujemo:

- bistrost vina 0-2 točki,
- barvo vina 0-2 točki,
- vonj vina 0-4 točke,
- okus vina 0-6 točk,
- harmoničnost vina 0-6 točk.

Ta pravilnik določa, da glede na ocene delimo vina v štiri kakovostne razrede. Vina, ki dosežejo vsaj 12,1 točke uvrščamo med namizna vina z nekontroliranim geografskim poreklom, tista z najmanj 14,1 pa med namizna vina z geografsko oznako. Vina, ki jih ocenimo z minimalno 16,1 točke uvrščamo med kakovostna vina z zaščitenim geografskim poreklom in tista, katera dosežejo oceno vsaj 18,1, med vrhunska vina.

3.3.5.2 Hitro profiliranje (Flash profiling)

Pri tej senzorični metodi gre za to, da preizkuševalec sam določi opisnik, ki po senzoričnih lastnostih najbolj okarakterizira analiziran vzorec vina. Na črto napiše opisnik (npr. sladkost, sadnost, po hruški, grenkoba, itd.), nato pa na lestvici od najmanj do najbolj, s črtnico označi intenzivnost izraženega opisnika, oz. kje med »najmanj intenzivno izražena lastnost« in »najbolj intenzivno izražena lastnost«, se določen vzorec nahaja. Hkrati določimo več okarakteriziranih deskriptorjev vsakemu vzorcu. Na isti lestvici označimo vse analizirane vzorce, katere določen deskriptor opiše. Tako dobimo prikaz, iz katerega hitro razberemo, kje po intenzivnosti določenega opisnika, se vsak vzorec nahaja (npr.: vzorec 10 je najmanj sladek, medtem ko sta vzorca 1 in 8 najbolj sladka).

3.3.5.3 Ocenjevanje arome vina z metodo CATA

Z metodo CATA (Check All That Apply) ali »Označi vse, kar ustreza«, ocenjujemo aromo vina, pri kateri ima preizkuševalec na voljo vrsto deskriptorjev, nato pa se odloči za vse tiste, ki senzorično najboljše okarakterizirajo aromo vina. Hkrati se lahko odloči za več opisov, ki ustrezajo za določen vzorec (npr.: za vzorec 1: po jabolku, po hruški, srednje intenzivna aroma).

3.3.5.4 Ocenjevanje všečnosti z 9-točkovno hedonsko lestvico

Pri hedonskem ocenjevanju senzorike vina lahko njegovo všečnost ocenjujejo tudi nešolani preizkuševalci. Ti imajo na voljo 9-stopenjsko lestvico ugajanja, pri kateri se morajo odločiti, kako visoko rangira določen vzorec vina. Na voljo imajo naslednje opise: ekstremno ne ugaja, zelo ne ugaja, dokaj ne ugaja, rahlo ne ugaja, niti ugaja niti ne ugaja, rahlo ugaja, dokaj ugaja, zelo ugaja in ekstremno ugaja.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI ANALIZ MOŠTA

4.1.1 Rezultati analize mošta z analizo WineScan™

V preglednici 5 so predstavljeni rezultati fizikalno-kemijske analize mošta sorte sauvignon, letnika 2015, katero smo opravili pred začetkom AF z metodo WineScan™ (WSC). Grozdni mošt je tekoč pridelek, z volumskim deležem dejanskega alkohola največ 1 % in je pridobljen iz grozdja brez ali s fizikalnimi postopki (Pravilnik o pogojih..., 2004).

Preglednica 5: Rezultati analize mošta z metodo WSC, na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica

Parameter	Vrednost/koncentracija	Enota
relativna gostota	1,0857	/
sladkorna stopnja	85,7	°Oe
sladkorna stopnja	20,12	°Brix
skupne kisline*	5,02	g/L, kot vinska kislina
pH	3,44	/
jabolčna kislina	2,66	g/L
vinska kislina	2,89	g/L
prosti aminokislinski dušik (FAN)	135,57	mg/L
glukoza in fruktoza	206,67	g/L
OD 280**	312	/
intenzivnost barve	1,45	(A.U.)
hlapne kisline*	0,17	g/L, kot očetna kislina
indeks FC	0,17	/
amonijak	113	mg/L
kalij	1334	mg/L
etanol	0,54	vol. %
glicerol	0	g/L
etil acetat	1	mg/L
mlečna kislina	0,07	g/L
manitol	0,03	mg/L
3-metil-1-butanol	0,13	mg/L
sorbitol	0,06	mg/L
acetaldehid	0,24	mg/L
glukoza	111,29	g/L
fruktoza	109,11	g/L

Legenda: * skupne kisline so izražene v g/L kot vinska kislina, hlapne kisline pa v g/L kot očetna kislina; ** OD 280 pomeni optično gostoto pri valovni dolžini 280 nm

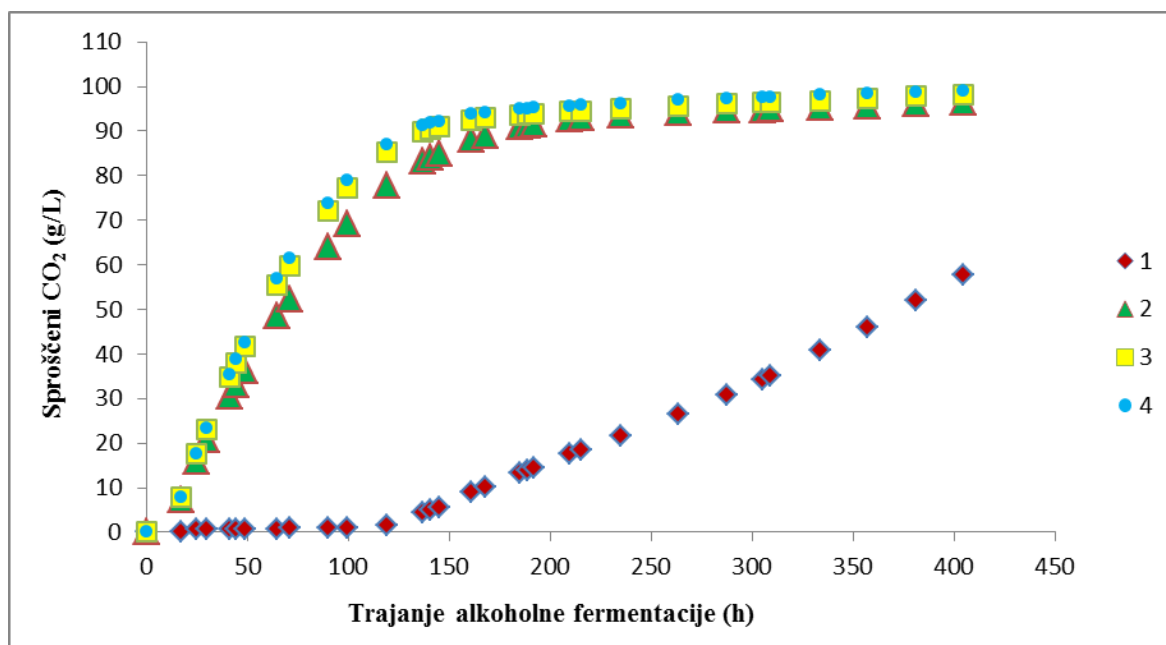
4.2 SPREMLJANJE KINETIKE ALKOHOLNIH FERMENTACIJ

Poskus smo zastavili tako, da smo inokulirali 14 vzorcev z dvema sevoma osušenih selekcioniranih vinskih kvasovk, s komercialnima imenoma Lalvin ICV OKAY in Uvaferm SLO, sev mlečnokislinske bakterije s komercialnim imenom Lallemmand OMEGA in hranilo za kvasovke, imenovanim RESKUE, kot je razvidno iz preglednice 3. Fermentacijski poskus je v dveh ponovitvah potekal 405 ur, kar znaša skoraj 17 dni.

Potek alkoholne fermentacije smo periodično spremljali gravimetrično s tehtanjem oddanega CO₂, na podlagi česar smo nato izrisali fermentacijske krivulje skupno 14-ih fermentacij. Med procesom alkoholne fermentacije se je masa vsebine fermentacijskih steklenic zniževala zaradi posledice oddanega CO₂, ki je nastajal med alkoholno fermentacijo, katere reakcija je povzročila pretvorbo glukoze v etanol. Po zaključenem fermentacijskem poskusu, smo v programu Excel izrisali fermentacijske krivulje posameznih vzorcev, ki prikazujejo količino sproščenega CO₂ (v g/L) v odvisnosti od časa (h). Prav tako smo izrisali krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev, kot spremembo mase oddanega CO₂ na časovno enoto (v g/L/h), v odvisnosti od časa (h). Fermentacijske krivulje in krivulje kinetike alkoholne fermentacije so za vse vzorce prikazane na slikah 6 do 13, v primerjavi s kontrolnim vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija.

Skozi fermentacijski poskus smo želeli ugotoviti, ali dodatek dveh različnih selekcioniranih kvasovk in mlečnokislinske bakterije, ter dodatek hranila za kvasovke sploh vplivajo (in v kolikšni meri) na potek ter dokončanje alkoholne fermentacije.

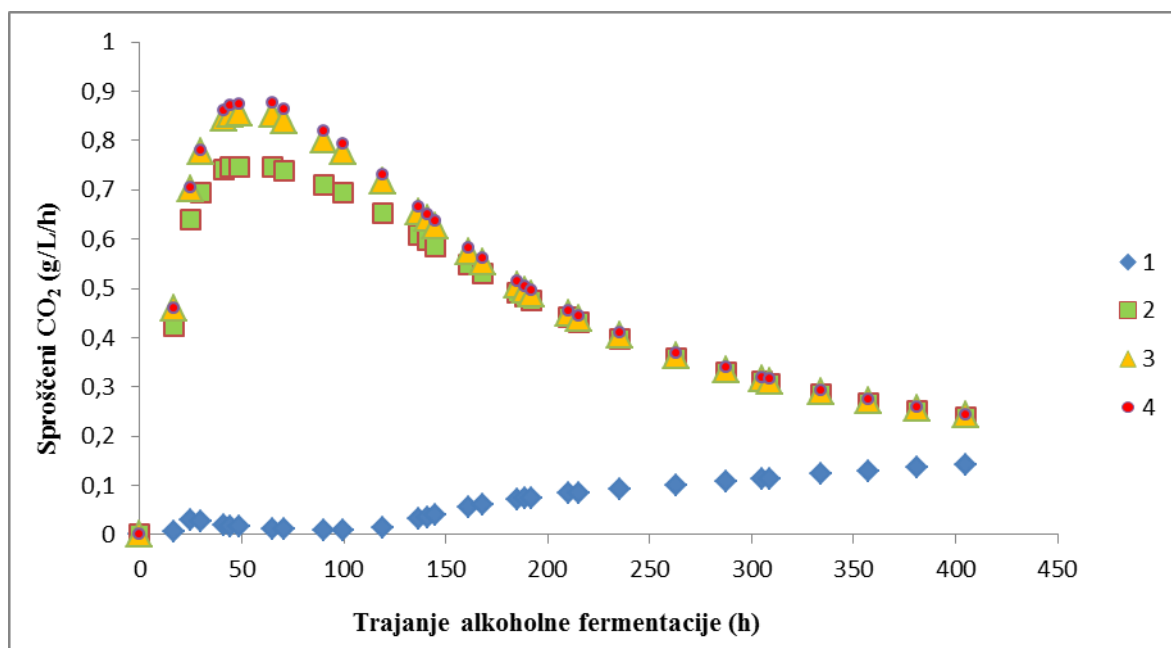
▪ Selekcionirana kvasovka Lalvin ICV OKAY



Slika 6: Fermentacijske krivulje vzorcev 2 (kvasovka Lalvin ICV OKAY), 3 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) in 4 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 1).

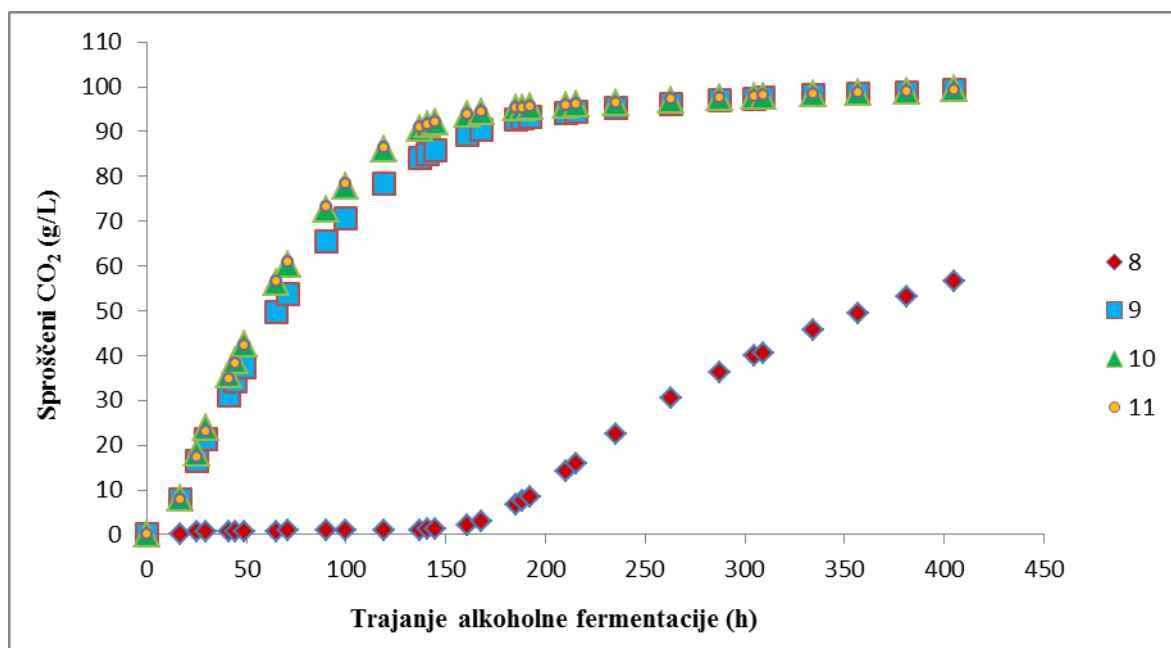
Slika 6 prikazuje oddani CO_2 (g/L) med alkoholno fermentacijo vzorcev 2, 3 in 4. Pri teh vzorcih smo uporabili komercialni sev suhih kvasovk Lalvin ICV OKAY, katere vsebujejo kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Vzorec 1 nam je služil za primerjavo, saj mu nismo dodali inokuluma in smo pustili, da je potekla spontana alkoholna fermentacija z endogeno mikrobioto. V vzorec 2 smo inokulirali omenjeno komercialno kvasovko. Vzorec 3 smo poleg komercialnega seva kvasovk, dodali hranilo za kvasovke RESKUE. V vzorec 4 smo poleg seva kvasovk Lalvin ICV OKAY in hranila za kvasovke RESKUE, dodali še MKB vrste *Oenococcus oeni*, pod komercialnim imenom Lallemend OMEGA.

Iz slike 6 je razvidno, da začetek alkoholne fermentacije v vseh treh vzorcih (2, 3 in 4) sovpada z začetkom fermentacije v kontrolnem vzorcu (1). Fermentacijske krivulje nam ponazarjajo, da je alkoholna fermentacija v vseh vzorcih, katerim so bile dodane startrske kulture, potekala bolj ali manj podobno. S spremljanjem poteka alkoholne fermentacije smo pri teh vzorcih potrdili pozitiven vpliv dodatka startrske kulture kvasovk, hranil za kvasovke in dodatka MKB, saj je iz fermentacijskih krivulj razvidno, da je bila koncentracija oddanega CO_2 neprimerno večja, v primerjavi z vzorcem 1. Največ oddanega CO_2 je v vzorcu z dodanimi kvasovkami, hranilom in MKB, sledi mu vzorec z dodatkom kvasovk in hranila ter nato vzorec, ki je vseboval samo selekcionirane kvasovke.



Slika 7: Krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev 2 (kvasovka Lalvin ICV OKAY), 3 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) in 4 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 1).

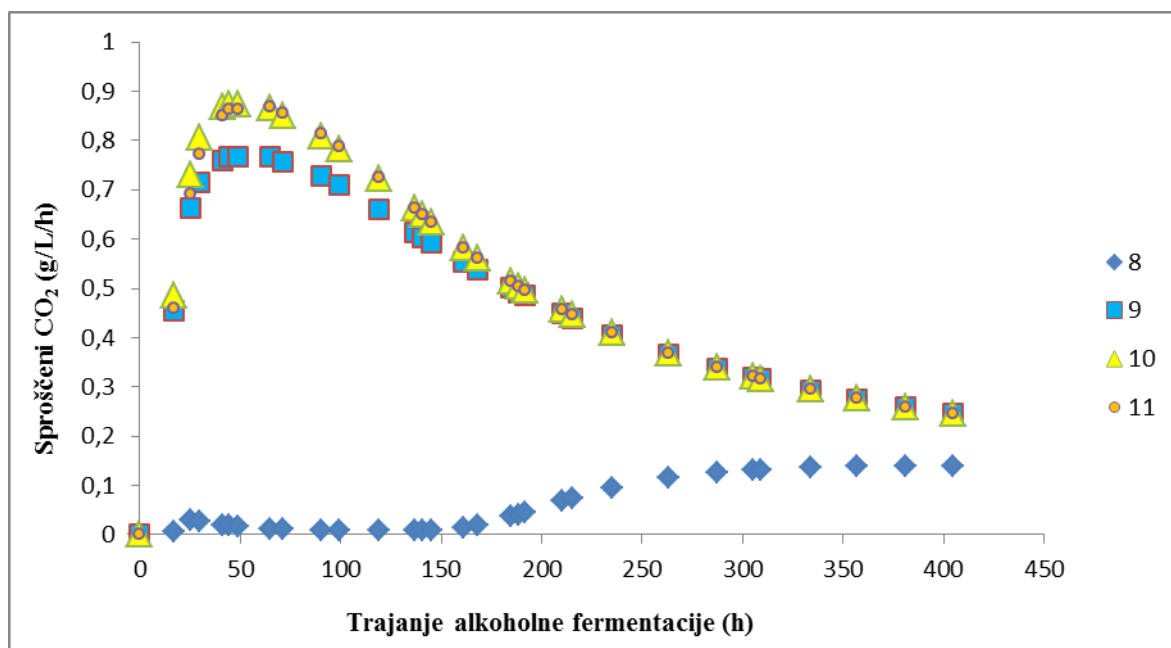
Bolje prikazana hitrost alkoholne fermentacije je vidna na grafu kinetike alkoholne fermentacije. Slika 7, ki prikazuje kinetiko alkoholne fermentacije oddanega CO_2 (g/L/h) za vzorce 2, 3 in 4 v primerjavi s kontrolnim vzorcem (1), nam pove, kdaj časovno so vzorci fermentirajočega mošta posameznih vrelnih steklenic dosegli največjo koncentracijo sproščenega CO_2 . Razlike v kinetiki oddanega CO_2 med vzorci 2, 3 in 4 niso velike. Hitrost sproščanja CO_2 najbolj narašča do 65. ure poteka fermentacijskega poskusa, kjer doseže tudi maksimum, nato prične skoraj linearno padati. Vzorec, kateremu smo dodali kvasovke, hranilo in MKB je dosegel maksimalno sproščanje CO_2 z intenziteto 0,88 g/L/h, sledi mu vzorec z dodatkom kvasovk in hranila z 0,85 g/L/h in nato vzorec z dodatkom komercialnih kvasovk z 0,75 g/L/h. Pri kontrolnem vzorcu (1) je koncentracija oddanega CO_2 ves čas rahlo naraščala in predvidevamo, da v času našega poskusa (405 ur), ni dosegla maksimalnega sproščanja CO_2 .



Slika 8: Fermentacijske krivulje vzorcev 9 (kvasovka Lalvin ICV OKAY), 10 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) in 11 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 8).

Na sliki 8 so prikazane fermentacijske krivulje vzorcev 9, 10 in 11, vzorec 8 pa prikazuje potek spontane alkoholne fermentacije z endogeno mikrobioo. Ti vzorci so paralelne ponovitve vzorcev 2, 3 in 4. Vzorcju 9 smo inokulirali kvasovke Lalvin ICV OKAY, vzorcju 10 smo poleg le-teh dodali hranilo za kvasovke RESKUE, vzorcju 11 pa smo poleg komercialnih kvasovk in hranila za kvasovke, dodali še mlečnokislinske bakterije Lallemand OMEGA.

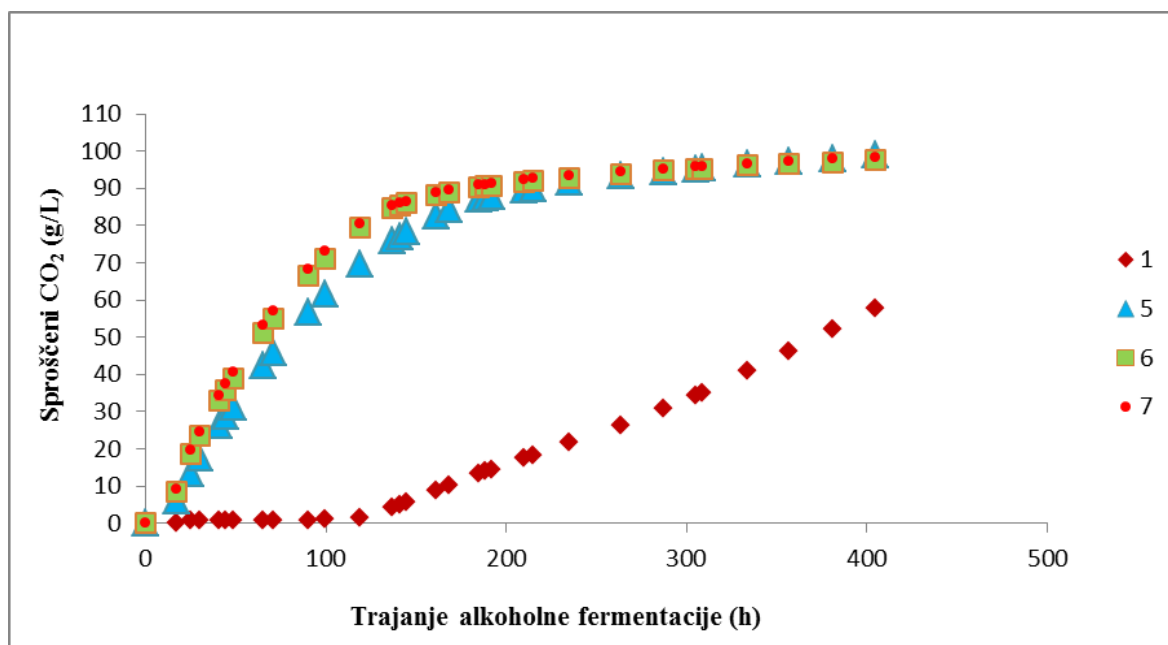
Iz slike 8 je razvidno, da začetek alkoholne fermentacije v vseh treh vzorcih (9, 10 in 11) sovпада z začetkom fermentacije v kontrolnem vzorcju (8), kakor je tudi pri prvi ponovitvi (slika 6). Fermentacijske krivulje nam prikazujejo, da je alkoholna fermentacija v vseh vzorcih, katerim so bile dodane startrske kulture, potekala bolj ali manj podobno. Krivulje so primerljive z vzorci 2, 3 ter 4 in pri njih smo prav tako potrdili pozitiven vpliv startrskih kultur na potek alkoholne fermentacije. Koncentracija oddanega CO₂ je v vseh treh vzorcih približno enaka in znaša 99 g sproščenega CO₂/L.



Slika 9: Krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev 9 (kvasovka Lalvin ICV OKAY), 10 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) in 11 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 8).

Slika 9 prikazuje kinetiko alkoholne fermentacije oddanega CO_2 za vzorce 9, 10 in 11, v primerjavi s kontrolnim vzorcem (8). Prav tako kot pri paralelni ponovitvi (slika 7), tudi med vzorci 9, 10 in 11 ni velike razlike v kinetiki oddanega CO_2 . Hitrost sproščanja CO_2 najhitreje narašča do 65. ure, pri kateri prav tako doseže maksimum. Vzorec 11 je dosegel maksimalno sproščanje CO_2 z intenziteto $0,87 \text{ g/L/h}$ in je primerljiv z vzorcem 4 ($0,88 \text{ g/L/h}$). Vzorec 10 je tudi dosegel $0,87 \text{ g/L/h}$ in sovpada s paralelnim vzorcem 3 ($0,85 \text{ g/L/h}$). Prav tako je vzorec 9 primerljiv z vzorcem 2 ($0,75 \text{ g/L/h}$), saj je le-ta dosegel vsebnost $0,77 \text{ g/L/h}$ oddanega CO_2 .

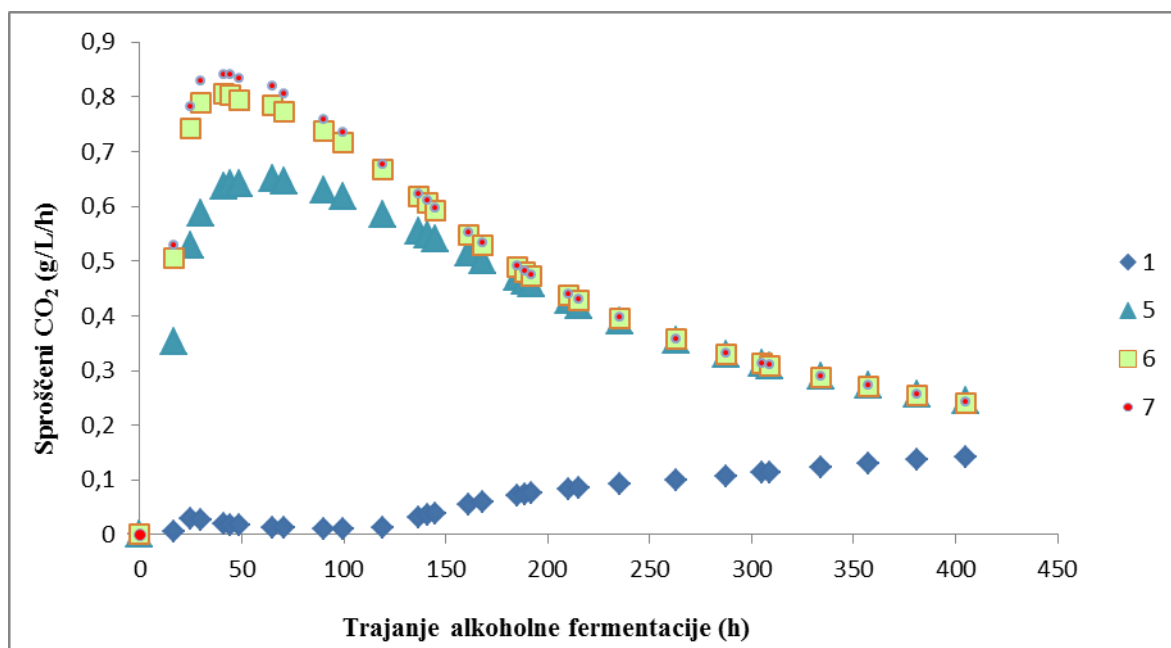
▪ Selekcionirana kvasovka Uvaferm SLO



Slika 10: Fermentacijske krivulje vzorcev 5 (kvasovka Uvaferm SLO), 6 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo) in 7 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 1).

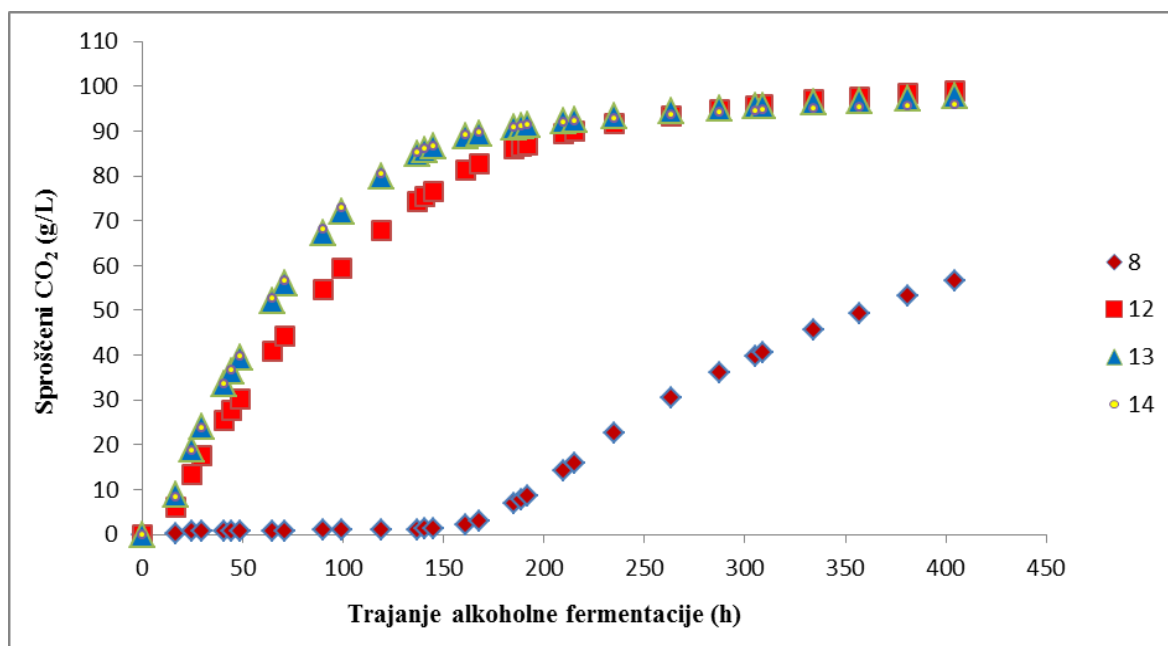
Slika 10 prikazuje oddani CO_2 (g/L) med alkoholno fermentacijo za vzorce 5, 6 in 7. Pri teh vzorcih smo uporabili komercialni sev suhih kvasovk Uvaferm SLO, katere vsebujejo kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Vzorec 1 nam je služil za primerjavo, saj mu nismo dodali inokuluma in smo pustili, da je potekla spontana alkoholna fermentacija. V vzorec 5 smo inokulirali omenjeno komercialno kvasovko. Vzorcju 6 smo poleg komercialnega seva kvasovk, dodali hranilo za kvasovke RESKUE. V vzorec 7 smo poleg seva kvasovk Uvaferm SLO in hranila za kvasovke RESKUE, dodali še mlečnokislinske bakterije vrste *Oenococcus oeni*, pod komercialnim imenom Lallemend OMEGA.

Iz slike 10 je razvidno, da začetek alkoholne fermentacije v vseh treh vzorcih (5, 6 in 7) sovpada z začetkom fermentacije v kontrolnem vzorcu (1). Fermentacijske krivulje nam prikazujejo, da je alkoholna fermentacija v vseh vzorcih, v katerih smo dodali startne kulture, potekala bolj ali manj enako. S spremljanjem fermentacijskih krivulj smo pri vzorcih, z inokulumom kvasovk Uvaferm SLO potrdili pozitiven vpliv dodatkov na potek alkoholne fermentacije, kot je to bilo tudi zaznati pri inokulaciji s komercialno kvasovko Lalvin ICV OKAY. V vzorcih 5, 6 in 7 so se sprostile približno enake količine CO_2 (98 g/L).



Slika 11: Krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev 5 (kvasovka Uvaferm SLO), 6 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo) in 7 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 1).

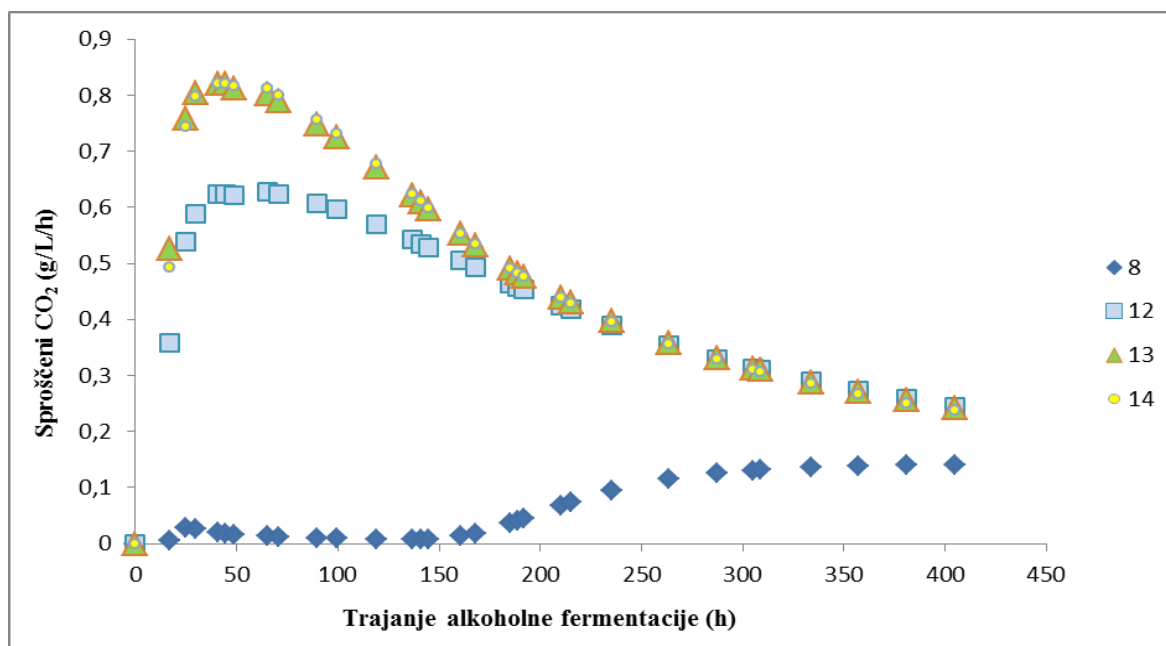
Na grafu kinetike alkoholne fermentacije je hitrost fermentacije bolj vidna. Na sliki 11, ki prikazuje kinetiko alkoholne fermentacije oddanega CO_2 (g/L/h) za vzorce 5, 6 in 7 v primerjavi s kontrolnim vzorcem (1), lahko vidimo, kdaj (pri kateri uri) so vzorci fermentirajočega mladega vina v posameznih vrelnih steklenicah dosegli največjo koncentracijo sproščenega CO_2 . Razlike v kinetiki oddanega CO_2 med temi tremi vzorci niso velike. Tudi pri teh krivuljah opazimo, da hitrost sproščanja CO_2 najbolj narašča do 65. ure (in doseže maksimum), nato prične padati. Vzorec z dodanimi kvasovkami, hranilom za kvasovke in MKB je dosegel maksimalno sproščanje CO_2 z intenziteto 0,82 g/L/h, sledi mu vzorec, kateremu smo dodali selekcionirane kvasovke in hranilo za njih z 0,79 g/L/h in vzorec z dodatkom kvasovk z 0,65 g/L/h. Pri kontrolnem vzorcu (1) je koncentracija oddanega CO_2 ves čas rahlo naraščala, vendar pričakovano ni dosegla maksimalnega sproščanja CO_2 .



Slika 12: Fermentacijske krivulje vzorcev 12 (kvasovka Uvaferm SLO), 13 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo) in 14 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 8).

Slika 12 prikazuje fermentacijske krivulje vzorcev 12, 13 in 14, medtem ko vzorec 8 ponazarja potek spontane alkoholne fermentacije. Ti vzorci so paralelne ponovitve vzorcev 5, 6 in 7. Vzorcju 12 smo dodali komercialne kvasovke, imenovane Uvaferm SLO, vzorcju 13 smo poleg le-teh inokulirali hranilo za kvasovke RESKUE, vzorcju 14 pa smo poleg suhih kvasovk in hranila za kvasovke dodali še mlečnokislinske bakterije, imenovane Lallemend OMEGA.

Iz slike 12 je razvidno, da začetek alkoholne fermentacije v vseh treh vzorcih (12, 13 in 14) sovpada z začetkom fermentacije v kontrolnem vzorcju (8), kakor je tudi pri paralelnih vzorcih (slika 10). Fermentacijske krivulje nam prikazujejo, da je alkoholna fermentacija v vseh vzorcih, katerim so bile dodane startrske kulture, potekala bolj ali manj podobno. Krivulje so primerljive z vzorci 5, 6 ter 7 in pri njih smo prav tako zaznali pozitiven vpliv startsrskih kultur na potek same alkoholne fermentacije. Največja koncentracija oddanega CO₂ je v vzorcju s komercialnimi kvasovkami (99 g/L), sledi mu vzorec, kateremu smo dodali kvasovke ter hranilo za kvasovke (98 g/L) in nato še vzorec, kateremu so bile poleg kvasovk in hranila dodane še MKB in znaša 96 g/L sproščenega CO₂.



Slika 13: Krivulje kinetike alkoholne fermentacije vzorcev 12 (kvasovka Uvaferm SLO), 13 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo) in 14 (kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB) v primerjavi z vzorcem, pri katerem je potekala spontana alkoholna fermentacija (vzorec 8).

Na sliki 13 je prikazana kinetika alkoholne fermentacije oddanega CO₂ za vzorce 12, 13 in 14, v primerjavi s kontrolnim vzorcem (8). Prav tako kot pri paralelni ponovitvi (slika 11), tudi med vzorci 12, 13 in 14 ni velike razlike v kinetiki oddanega CO₂. Hitrost sproščanja CO₂ tudi tukaj najhitreje narašča do 65. ure. Vzorec 14 je dosegel maksimalno sproščanje CO₂ z intenziteto 0,81 g/L/h in je primerljiv z vzorcem 7 (0,82 g/L/h). Vzorec 13 je dosegel vrednost 0,80 g/L/h in sovпада s paralelnim vzorcem 6 (0,79 g/L/h). Prav tako je vzorec 12 primerljiv z vzorcem 5 (0,65 g/L/h), saj je le-ta dosegel vrednost 0,63 g/L/h oddanega CO₂.

Vsi dobljeni rezultati fermentacijskih krivulj in krivulj kemijske kinetike potrjujejo, da se z dodatkom startskih kultur kvasovk, mlečnokislinskih bakterij in hranil za kvasovke bistveno skrajša faza prilagajanja kvasovk (»lag« faza), posledično je hitrejši in učinkovitejši začetek alkoholne fermentacije (intenzivnejše sproščanje CO₂), glede na kontrolna vzorca, kjer je potekala spontana alkoholna fermentacija z endogeno mikrobioto.

Pri pridelavi vina je ravno zaradi hitrejšega začetka alkoholne fermentacije zaželena čim krajša faza prilagajanja kvasovk. Kot je bilo pričakovati, je v kontrolnih vzorcih (1 in 8) proces spontane alkoholne fermentacije stekel počasneje. Daljša faza prilagajanja kvasovk in nezadostna pretvorba sladkorja v etanol, sta le dve izmed neželenih lastnosti naravno prisotne mikrobiote mošta, katera se običajno nahaja tudi v zelo majhnem številu. Ravno tema dvema lastnostnima lahko pripišemo krivdo, da je povprečna vsebnost reducirajočih sladkorjev v kontrolnih vzorcih močno nad vsebnostjo reducirajočih sladkorjev v ostalih vzorcih (slika 17).

Iz vseh slik (Slike 6 do 13) so razvidne minimalne razlike v kinetiki alkoholne fermentacije med vzorci z različnimi dodatki. V povprečju so malenkost bolj fermentirale komercialne kvasovke Lalvin ICV OKAY (vzorci 2-4 in 9-11) pred kvasovkami Uvaferm SLO (vzorci 5-7 in 12-14). Največ oddanega CO₂ je bilo v obeh primerih pri vzorcih, katerim smo poleg omenjenih kvasovk dodali še hranilo za kvasovke RESKUE in mlečnokislinske bakterije Lallemand OMEGA (4, 7, 11 in 14). Sledijo vzorci z inokulumom kvasovk ter hranila (3, 6, 10 in 13) in na koncu vzorci s samim dodatkom komercialnih kvasovk (2, 5, 9 in 12). Najslabše sta fermentirala kontrolna vzorca (1 in 8), pri katerima je potekala spontana AF. Pri njima je daljši potek faze prilagajanja endogene kvasne populacije lepo viden na vseh fermentacijskih krivuljah ter krivuljah kemijske kinetike.

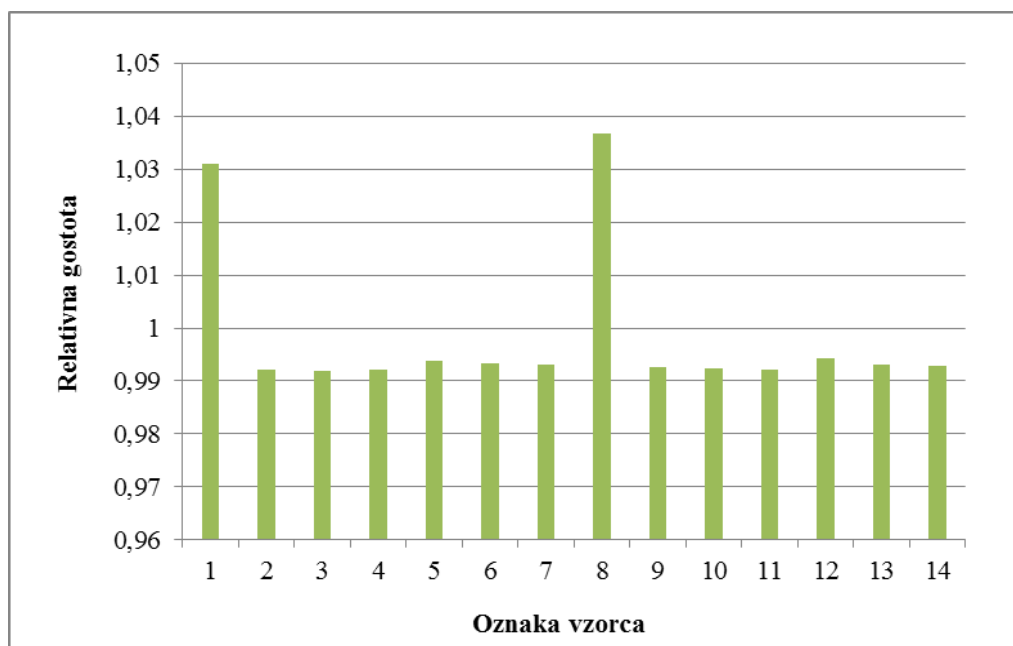
4.3 REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH ANALIZ MLADEGA VINA

4.3.1 Fizikalno-kemijske karakteristike mladega vina, določene z analizo WineScan

Po zaključeni alkoholni fermentaciji je bilo mlado vino analizirano na številne parametre z analizo WSC, na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica. V preglednici 6 so predstavljeni rezultati analize.

- Relativna gostota

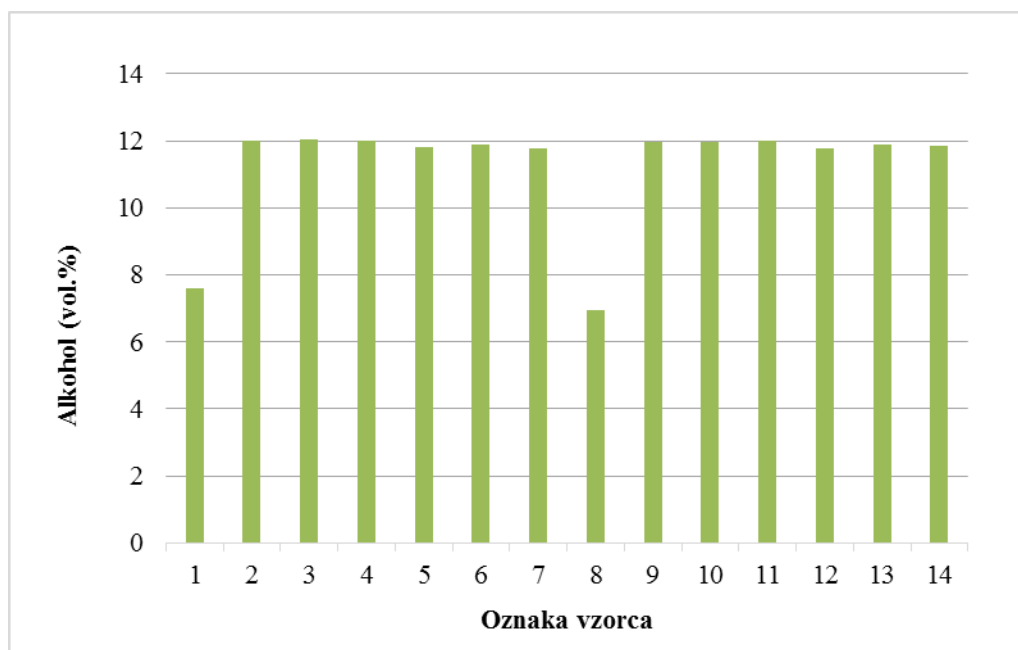
Slika 14 prikazuje relativno gostoto mladih vin po alkoholni fermentaciji, iz katere razberemo, da smo največjo relativno gostoto določili v vzorcih 1 in 8 (1,03 in 1,04), kjer je potekala spontana AF. Ti rezultati so pričakovani, saj AF pri teh vzorcih ni potekala optimalno in je v njih ostala večja količina nepovretega sladkorja (reducirajočih sladkorjev), ki se ni pretvorila v alkohol. Povišana koncentracija sladkorjev v vinu posledično vpliva na njegovo večjo relativno gostoto. Ker so vrednosti ostalih vzorcev med seboj primerljive in znašajo okoli 0,99, ne moremo trditi, da so kakšne razlike v relativni gostoti vina, če moštu dodamo kvasovke Lalvin ICV OKAY ali Uvaferm SLO, prav tako dodatek hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemand OMEGA ne vplivata na relativno gostoto mladih vin. Povprečna največja relativna gostota je bila v kontrolnem vzorcu ($1,0340 \pm 0,029$), najmanjša pa v vzorcu, kjer smo kvasovkam Lalvin ICV OKAY dodali hranila ter vzorec inokulirali še z MKB ($0,99215 \pm 0,00005$).



Slika 14: Rezultati določitve vrednosti relativne gostote v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

- Koncentracija alkohola

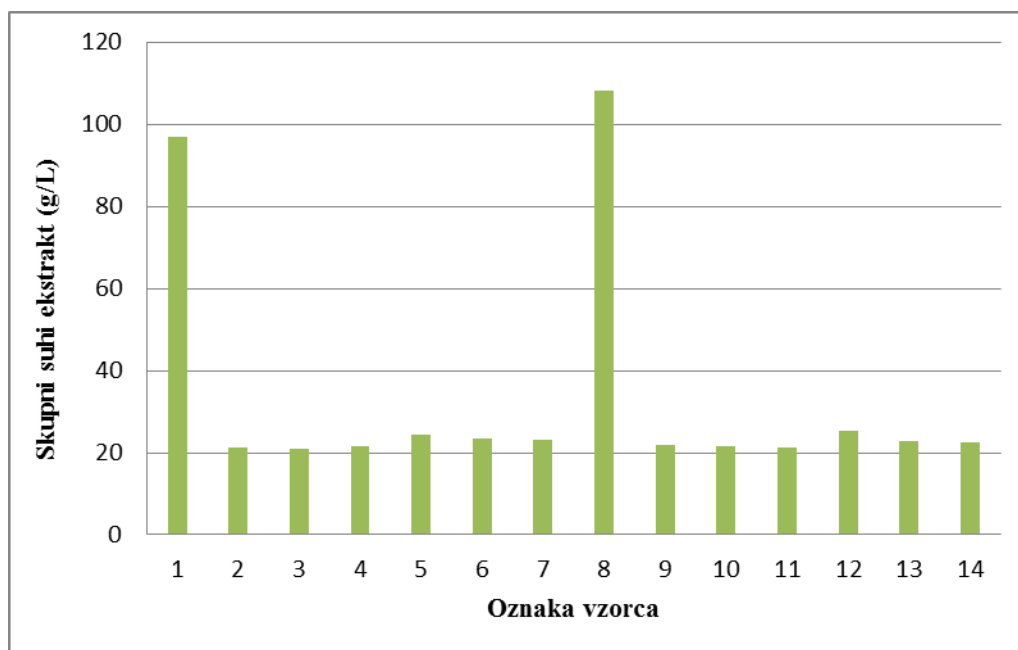
Ker je v kontrolnih vzorcih 1 in 8 potekala spontana AF, sta ta imela manjšo alkoholno stopnjo ($7,59$ in $6,96$ vol.%) kot ostali vzorci, kar je prikazano na sliki 15. Vzrok za to je v počasnem in neoptimalnem delovanju endogene mikrobiote v moštu, katera ni uspela v celoti pretvoriti sladkorjev v etanol, zato je v teh dveh vzorcih preostala tudi večja vsebnost reducirajočih sladkorjev. Vsi ostali vzorci so dosegli približno enake povprečne vrednosti alkoholne stopnje, in sicer okoli 12 vol.%. Lahko trdimo, da so komercialne kvasovke Lalvin ICV OKAY v povprečju tvorile za $0,2$ vol.% več alkohola, kot Uvaferm SLO in da dodatek hranil za kvasovke v našem primeru ni vplival na količino pridelanega alkohola, kot je to bilo pričakovati. Prav tako na količino nastalega etanola ni vplival dodatek mlečnokislinskih bakterij. Največjo alkoholno stopnjo je dosegel vzorec z dodatkom kvasovk Lalvin ICV OKAY ter hranila ($12,01 \pm 0,03$ vol.%), najmanjšo pa kontrolni vzorec ($7,28 \pm 0,32$ vol.%).



Slika 15: Rezultati določitve alkohola (vol.%) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

▪ Skupni suhi ekstrakt

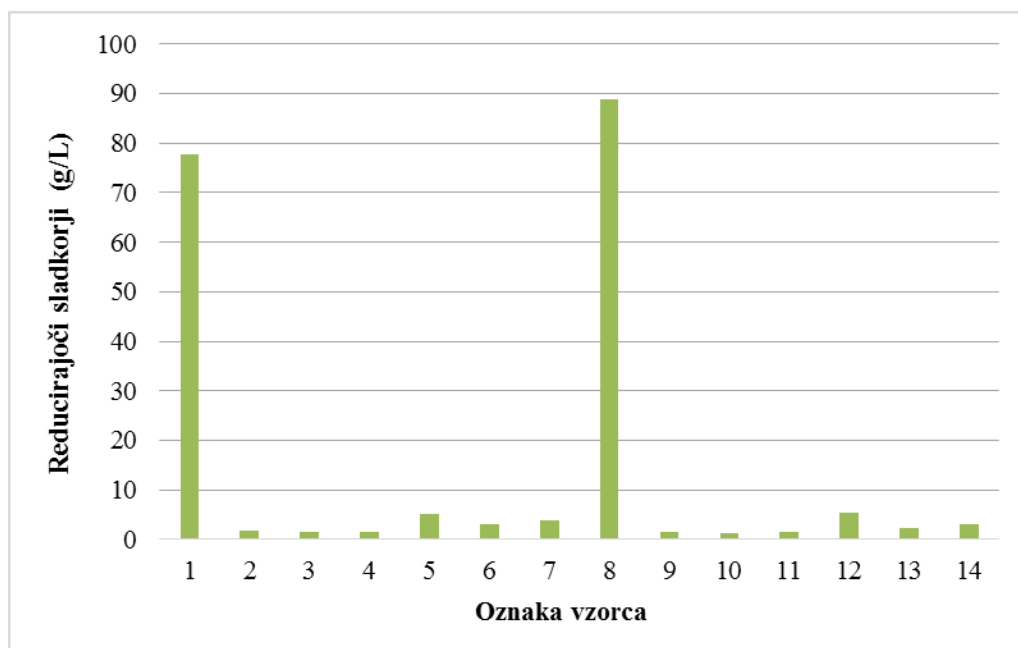
V povprečju je bilo skupnega suhega ekstrakta v mladih vinih med 21 in 25 g/L, kot je prikazano na sliki 16. Tudi tukaj sta ponovno izjemi kontrolna vzorca (1 in 8), saj je njuna vsebnost petkrat večja (96,96 in 108,20 g/L), glede na inokulirane vzorce, zopet na račun večje vsebnosti reducirajočih sladkorjev v mladem vinu. Lahko rečemo, da so kvasovke Uvaferm SLO na račun reducirajočih sladkorjev v povprečju tvorile za 3 g/L več SSE, kot kvasovke Lalvin ICV OKAY. Dodatek hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemend OMEGA sta povzročila malenkost manjšo vsebnost SSE, kot če ju vzorcem nismo dodali. Največje povprečje skupnega suhega ekstrakta je bilo v kontrolnem vzorcu ($102,58 \pm 5,62$) g/L, sledil mu je vzorec s kvasovkami Uvaferm SLO ($24,84 \pm 0,37$) g/L, najmanj SSE pa je bilo v vzorcu, kateremu smo dodali kvasovke Lalvin ICV OKAY in hranilo ($21,36 \pm 0,30$) g/L.



Slika 16: Rezultati določitve koncentracije skupnega suhega ekstrakta (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

▪ Reducirajoči sladkorji

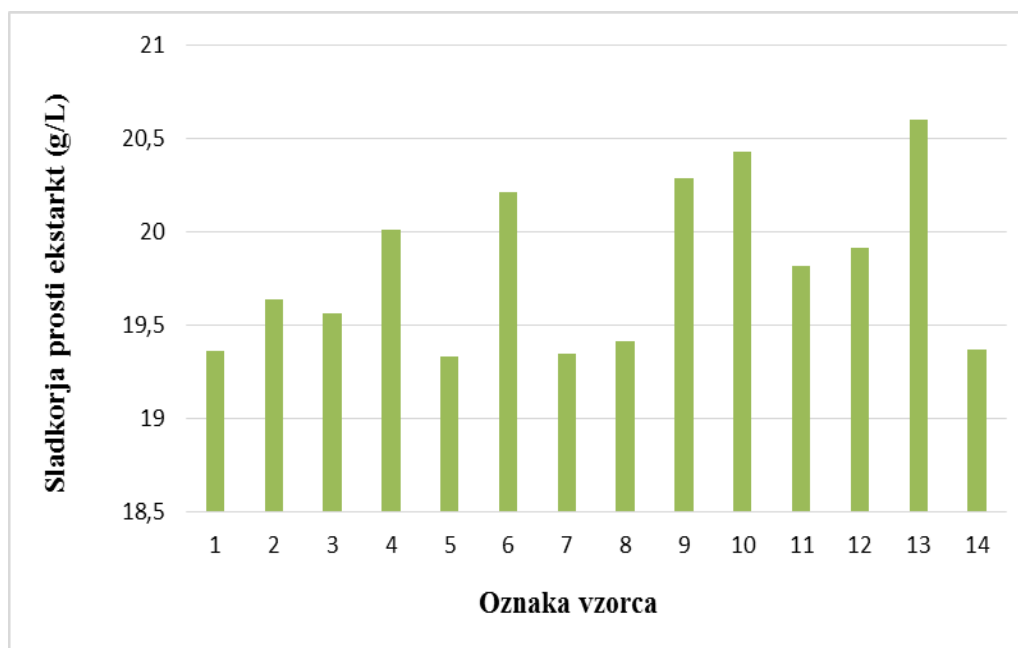
Največjo vsebnost reducirajočih sladkorjev (RS) smo določili v kontrolnih vzorcih 1 in 8 ($83,20 \pm 0,60$) g/L, kot je bilo tudi pričakovati, zaradi počasne in nekontrolirane fermentacije, saj se sladkor v moštu ni v celoti pretvoril v etanol, zato imata ta vzorca večjo vsebnost sladkorjev in manjšo alkoholno stopnjo. Ostali vzorci so imeli med seboj primerljivejše koncentracije reducirajočih sladkorjev, kateri so bili med 2 in 5 g/L (slika 17). Ugotovili smo, da je bil s pomočjo kvasovk Lalvin ICV OKAY trikrat manjši preostanek RS v vzorcih ($1,64 \pm 0,13$) g/L, kakor pri tistih, katerim smo dodali komercialne kvasovke Uvaferm SLO ($5,22 \pm 0,08$) g/L. Največ RS se je porabilo v vzorcih, katerim smo poleg kvasovk dodali tudi hranilo za kvasovke ($1,37 \pm 0,14$) g/L, medtem ko je bil preostanek RS v vzorcih s hranilom za kvasovke in MKB malenkost večji ($1,37 \pm 0,14$) g/L.



Slika 17: Rezultati določitve koncentracije reducirajočih sladkorjev (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

- Sladkorja prosti ekstrakt

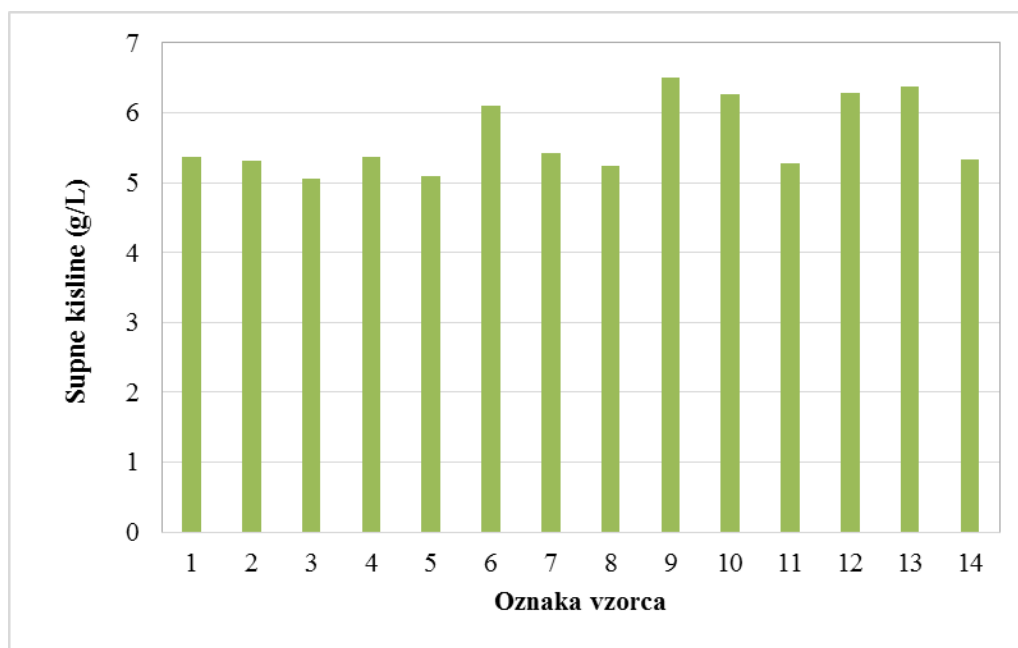
Največ sladkorja prostega ekstrakta (SPE) je bilo v vzorcu 13, in sicer 20,6 g/L, najmanj pa v vzorcih 1, 5 in 8, kateri so imeli to vsebnost okoli 19,5 g/L. Za kontrolna vzorca 1 in 8 je ta rezultat pričakovan, saj je bila v teh dveh vzorcih prisotna večja vsebnost RS, posledično je vsebnost sladkorja prostega ekstrakta manjša. Ugotovili smo, da ne moremo z gotovostjo trditi, katera vrsta kvasovk je odgovorna za večje vsebnosti SPE, tudi vpliva hranila za kvasovke in MKB na vsebnost SPE ne moremo natančno določiti, saj se povprečne vsebnosti med vzorci bistveno ne razlikujejo. Povprečno največjo vsebnost SPE je imel vzorec z dodatkom kvasovk Uvaferm SLO ter hranila ($20,41 \pm 0,20$) g/L, najmanjšo pa kontrolni vzorec ($19,39 \pm 0,03$) g/L.



Slika 18: Rezultati določitve koncentracije sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

- Skupne (titrabilne) kisline

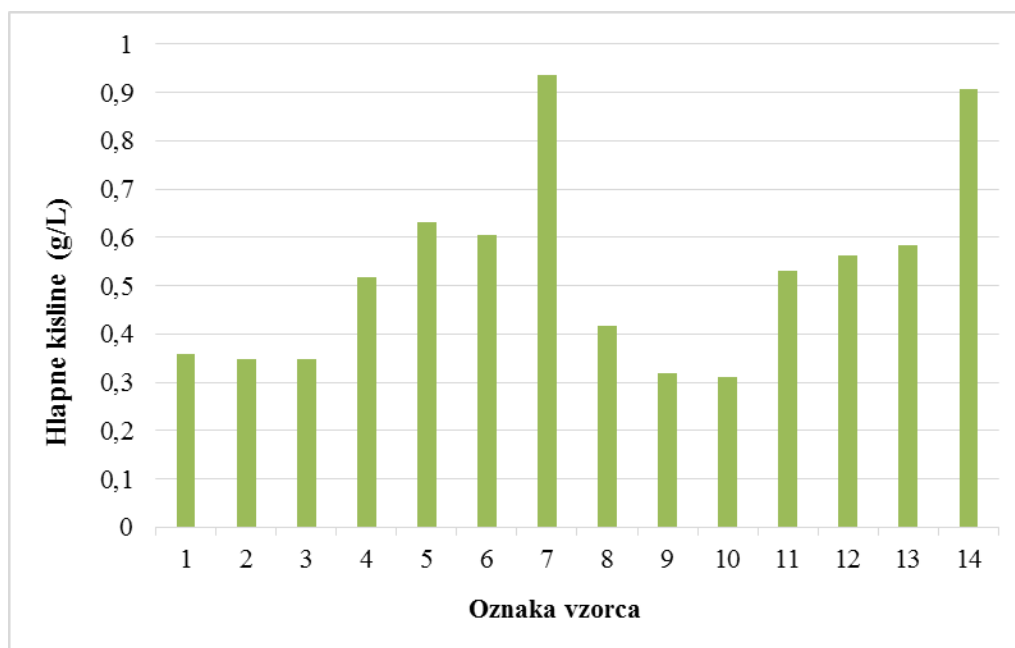
Na sliki 19 lahko vidimo rezultate vsebnosti skupnih kislin (SK) v naših vzorcih po zaključeni alkoholni fermentaciji in znaša med 5,30 in 6,50 g/L. Če primerjamo koncentracije skupnih kislin v moštu pred AF, ki je znašala 5,02 g/L, lahko opazimo, da so se v mladih vinih te vsebnosti še nekoliko povečale. Tako je koncentracija skupnih kislin v vseh vzorcih mladih vin večja, kakor v moštu, kar je najverjetneje posledica neprilagojenosti kvasovk na fermentacijske razmere in s tem tvorbo novih kislin v ciklusu trikarboksilnih kislin (TCA ciklu). Najmanjša koncentracija skupnih kislin je bila v vzorcu 3 in je znaša 5,05 g/L, največja pa je s 6,50 g/L bila v vzorcu 9. Kvasovke, ki smo jih uporabili pri vzorcih 5, 6, 7 oz. 12, 13, 14 (Uvaferm SLO) so v primerjavi s kvasovkami Lalvin ICV OKAY med fermentacijo tvorile več skupnih kislin, medtem ko je v obeh primerih dodatek mlečnokislinskih bakterij zmanjšal njihovo nastajanje. Povprečne vsebnosti SK so bile največje pri vzorcu s kvasovkami Uvaferm SLO in hranilom ($6,25 \pm 0,14$) g/L, najmanjše pa pri kontrolnem vzorcu ($5,30 \pm 0,06$) g/L.



Slika 19: Rezultati določitve koncentracije skupnih kislin (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

- Hlapne kisline

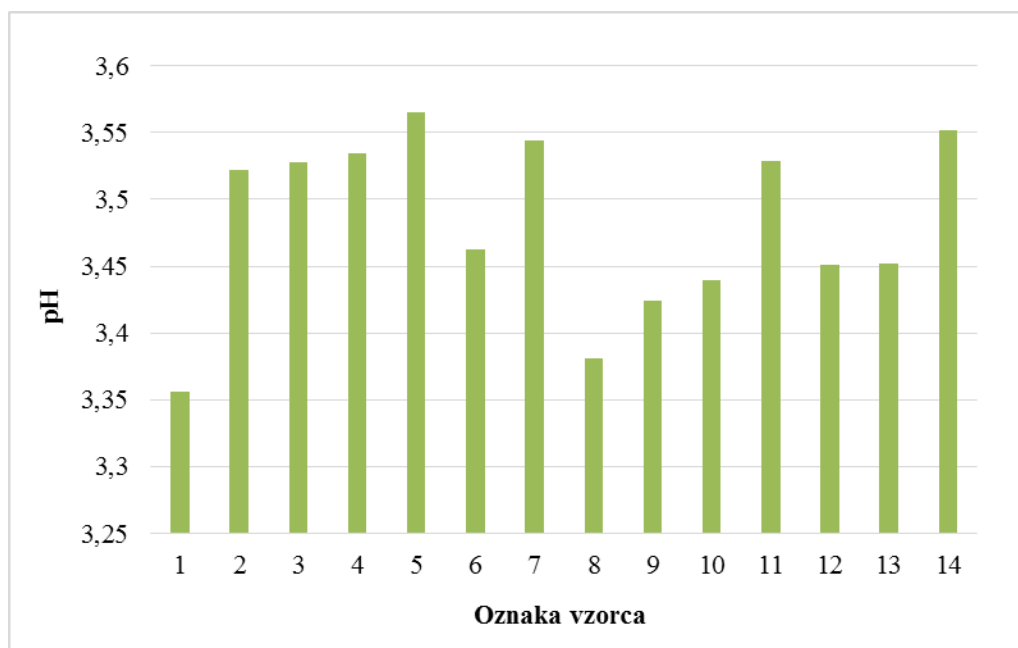
Iz slike 20 lahko vidimo, da imajo vsa mlada vina koncentracijo hlapnih kislin (HK) pod maksimalno zakonsko dovoljeno mejo (1 g/L) in so zato ustrezna. Največja vsebnost hlapnih kislin je bila določena v vzorcih 7 in 14, kar je najverjetneje posledica delovanja mlečnokislinskih bakterij, ki smo jih dodali pred začetkom AF. Vsebnost hlapnih kislin se lahko poveča med biološkim razkissom, saj MKB z razgradnjo citronske kisline tvorijo tudi manjše koncentracije očetne kisline. Do povišanja HK lahko pripelje tudi oksidacija vina. HK smo v moštu določili 0,17 g/L in pričakovano se je njihova vsebnost med AF povečala. Največjo vsebnost hlapnih kislin smo določili v vzorcu 7 (0,94 g/L), najmanjšo pa v vzorcu 10 (0,31 g/L). Vsebnosti HK so bile večje v vzorcih z dodatkom kvasovke Uvaferm SLO, kot pri kvasovkah Lalvin ICV OKAY. Dodatek mlečnokislinskih bakterij je močno povečal vsebnosti HK v vseh vzorcih. Največjo povprečno vsebnost HK smo določili v vzorcu, kateremu smo dodali kvasovke Uvaferm SLO, hranilo za kvasovke ter MKB ($0,92 \pm 0,02$) g/L, najmanjšo pa v vzorcu s kvasovkami Lalvin ICV OKAY in hranilom za kvasovke ($0,33 \pm 0,02$) g/L.



Slika 20: Rezultati določitve koncentracije hlapnih kislin (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

▪ Vrednost pH

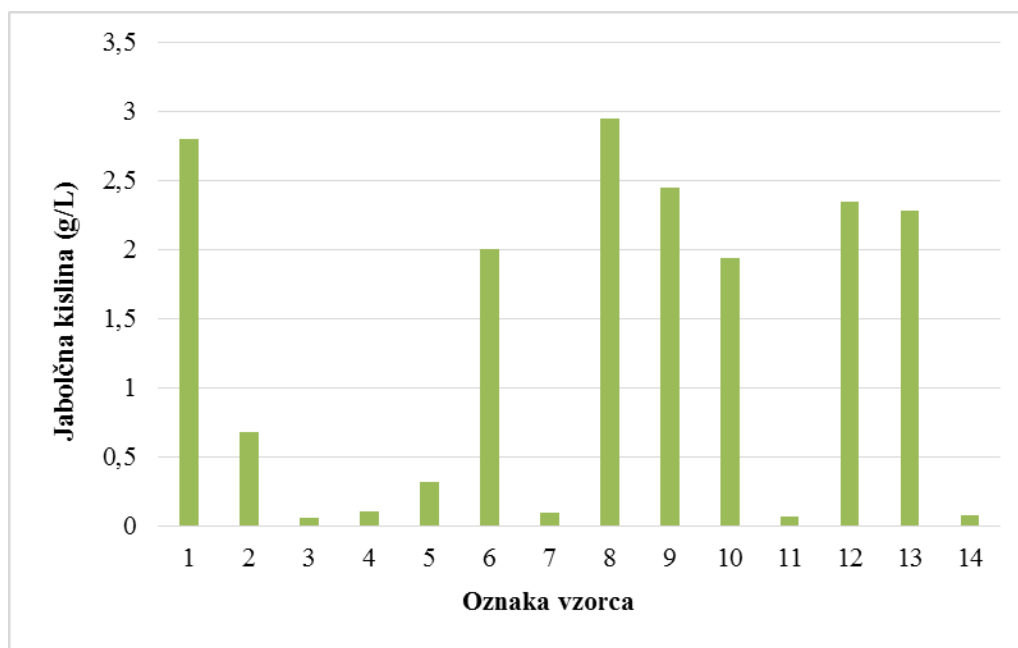
Iz slike 21 je opaziti, da so vrednosti pH v običajnih mejah in se je v primerjavi z moštom, ki je imel to vrednost 3,44, povečal. Le pri kontrolnih vzorcih 1 in 8, smo določili nižji pH, kot je le-ta bil v moštu. Pri vzorcih 4, 7, 11 in 14 je povišanje pH posledica MLF, ki pretvori jabolčno kislino v mlejšo mlečno, padec kislin je posledično odgovoren za dvig vrednosti pH. Povišanje pH bi lahko bila tudi posledica izločanja vinske soli. Najvišjo vrednost pH je imel vzorec 5 s 3,57, najnižjo pa vzorec 1 in je znašala 3,36. V našem primeru ne moremo reči, da je kakšna bistvena razlika v pH-ju, če dodamo različni vrsti komercialnih vinskih kvasovk. Povišano pH vrednost je bilo očitno zaznati pri dodatku mlečnokislinskih bakterij v vzorec, medtem ko ob dodatku hranil za kvasovke nismo zaznali nobene povezave z očitno spremembo v vrednosti pH vzorcev. Povprečno najnižji pH je imel kontrolni vzorec ($3,37 \pm 0,01$), najvišjega pa vzorec, kateremu smo dodali kvasovke Uvaferm SLO, hranilo za kvasovke ter MKB ($3,55 \pm 0,00$).



Slika 21: Rezultati določitve vrednosti pH v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

▪ Jabolčna kislina

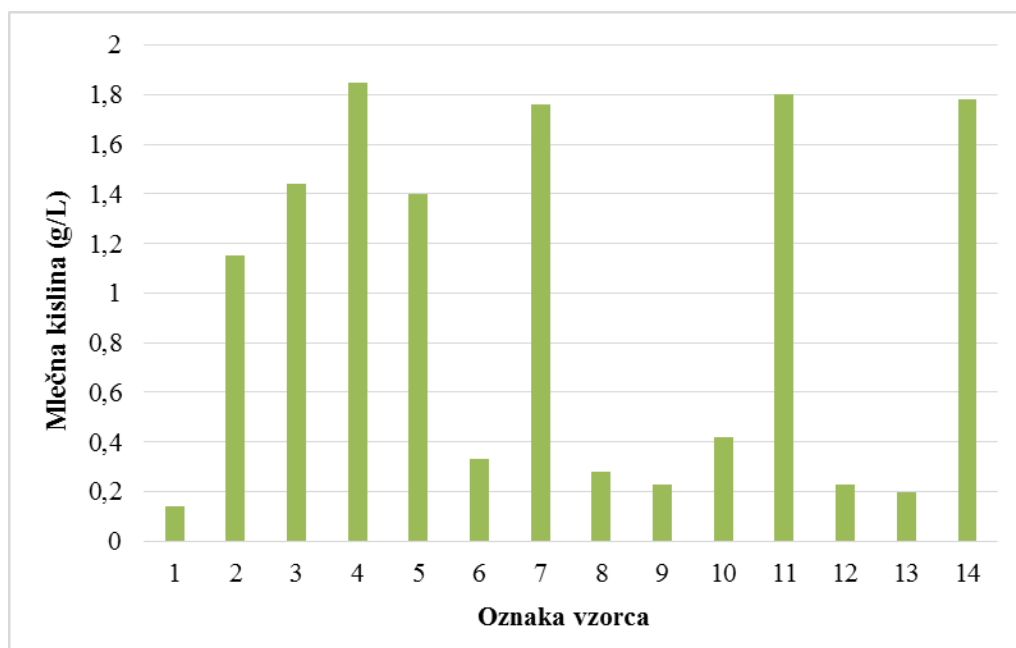
Jabolčne kisline je bilo v moštu 2,66 g/L, v vseh vzorcih mladih vin, razen v kontrolnih 1 in 8, se je njena koncentracija znižala, kot vidimo na sliki 22. Tako, kot smo pričakovali, je bila koncentracija jabolčne kisline občutno najmanjša v vzorcih 4, 7, 11 in 14, katerim so bile dodane MKB in je potekla jabolčno-mlečnokislinska fermentacija. Najmanjša vsebnost jabolčne kisline je bila v vzorcu 3 in je znašala 0,06 g/L, predvidevamo, da je v tem vzorcu potekla spontana MLF, saj je nastala večja količina mlečne kisline, kot običajno (slika 23). Razlike med dodatkom obeh vrst kvasovk in hranila za kvasovke RESKUE v količini jabolčne kisline ni bilo zaznati. Največjo povprečno vsebnost jabolčne kisline smo določili v vzorcu s kvasovko Uvaferm SLO in hranilom ($2,14 \pm 0,14$) g/L, najbolj pa se je le-ta zmanjšala v vzorcu, kateremu smo dodali kvasovke Lalvin ICV OKAY, hranilo in MKB ($0,09 \pm 0,02$) g/L.



Slika 22: Rezultati določitve koncentracije jabolčne kisline (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

▪ Mlečna kislina

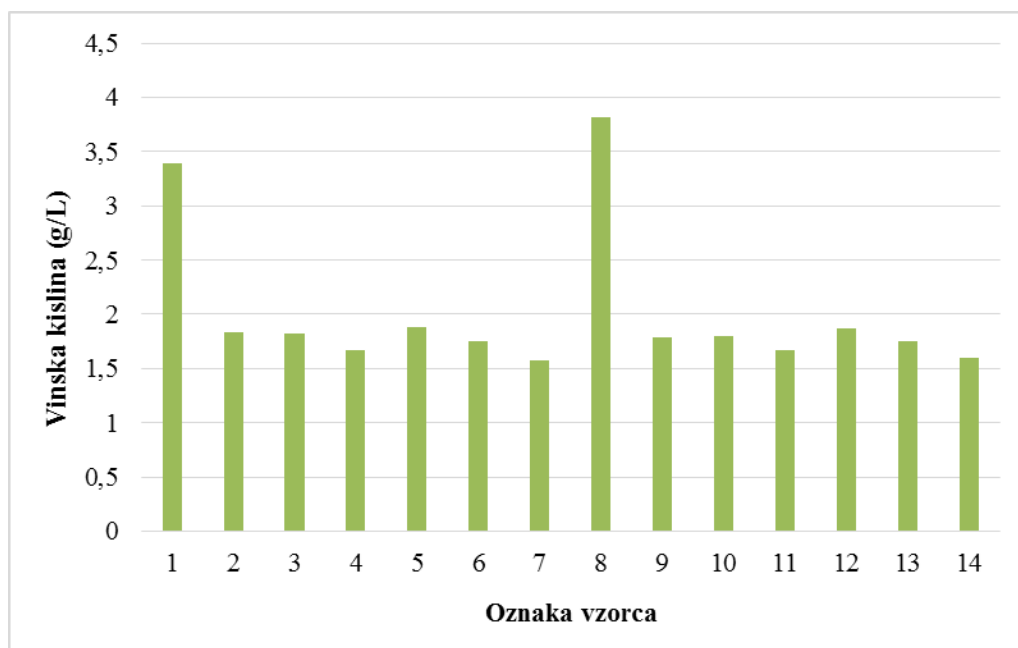
Najmanjšo vsebnost mlečne kisline smo določili v vzorcu 1 in je znašala 0,14 g/L. Na sliki 23 vidimo, da je daleč največ mlečne kisline nastalo v vzorcih 4, 7, 11 in 14 (okoli 1,8 g/L), katerim smo dodali mlečnokislinske bakterije Lallemend OMEGA in je potekla MLF. Ti rezultati so v skladu z našimi pričakovanji, posledično pa je v teh vzorcih koncentracija jabolčne kisline najmanjša (slika 22). Razlike v količini mlečne kisline v vinu nismo zaznali ob dodatku obeh vrst vinskih kvasovk. Prav tako na koncentracijo mlečne kisline ne vpliva dodatek hranil za kvasovke. Povprečno največja koncentracija mlečne kisline je bila v vzorcu, ki je vseboval kvasovke Lalvin ICV OKAY, hranilo ter MKB ($1,83 \pm 0,03$) g/L, najmanjša pa v kontrolnem vzorcu ($0,21 \pm 0,07$) g/L.



Slika 23: Rezultati določitve koncentracije mlečne kisline (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

▪ Vinska kislina

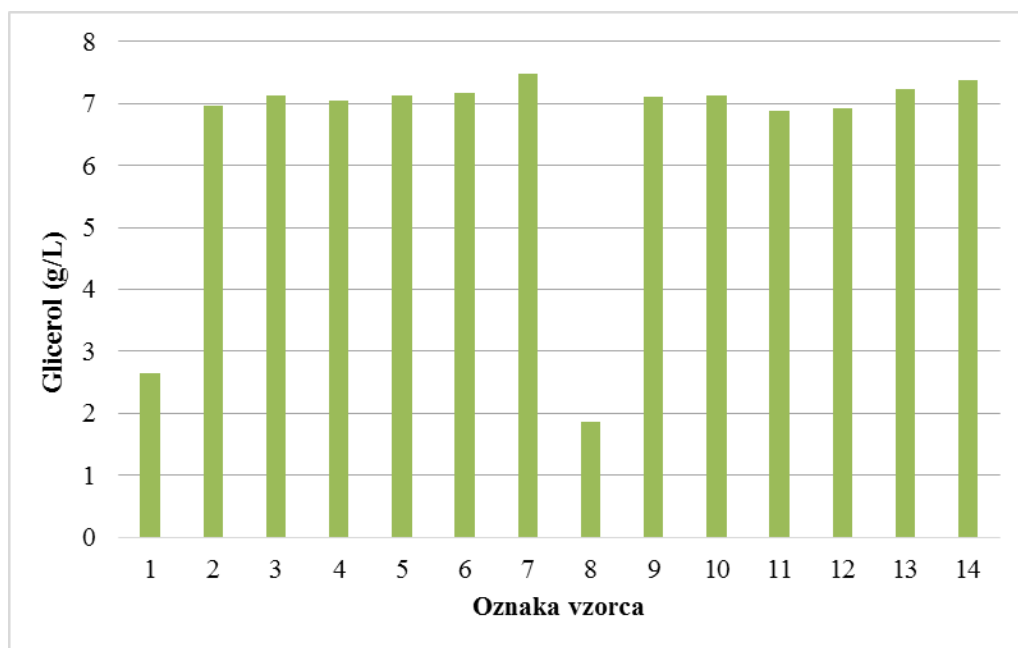
Vinske kisline je bilo v moštu 2,89 g/L. Kot vidimo na sliki 24, so njene vsebnosti v vseh vzorcih mladega vina manjše od pričakovanih (2 do 10 g/L), le v vzorcih 1 in 8 se je njena koncentracija povišala ($3,61 \pm 0,22$) g/L. Ob razgradnji vinske kisline običajno sumimo na kvar vina, kar se odraža tudi na povišanih hlapnih kislinah, česar pa za vzorce našega vina ne moremo trditi. Ob dodatku obeh vrst vinskih kvasovk Lalvin ICV OKAY in Uvaferm SLO ni bilo opaziti razlike v vsebnosti vinske kisline v vzorcih mladih vin. Nekoliko so bile manjše vsebnosti ob dodatku hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemend OMEGA ($1,59 \pm 0,00$) g/L v primerjavi z vzorci, kjer le-teh nismo dodali.



Slika 24: Rezultati določitve koncentracije vinske kisline (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

- Glicerol

Slika 25 nam prikazuje koncentracije glicerola v mladih vinih, ki je v povprečju pri vseh vzorcih okoli 7 g/L, razen pri vzorcih 1 in 8 je ta vsebnost bila občutno manjša (2,65 in 1,87 g/L). Ob dodatku obeh vrst vinskih kvasovk Lalvin ICV OKAY in Uvaferm SLO ni bilo opaziti razlike v vsebnosti glicerola v vzorcih mladih vin. Prav tako ne moremo reči, da je dodatek hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemund OMEGA vplival na vsebnost glicerola v vinu. V povprečju so bile najmanjše vsebnosti glicerola v kontrolnem vzorcu ($2,26 \pm 0,39$) g/L, največje pa v vzorcu s kvasovkami Uvaferm SLO, hranilom ter MKB ($7,44 \pm 0,06$) g/L.



Slika 25: Rezultati določitve koncentracije glicerola (g/L) v mladem vinu, opravljene z WineScan™ analizo (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

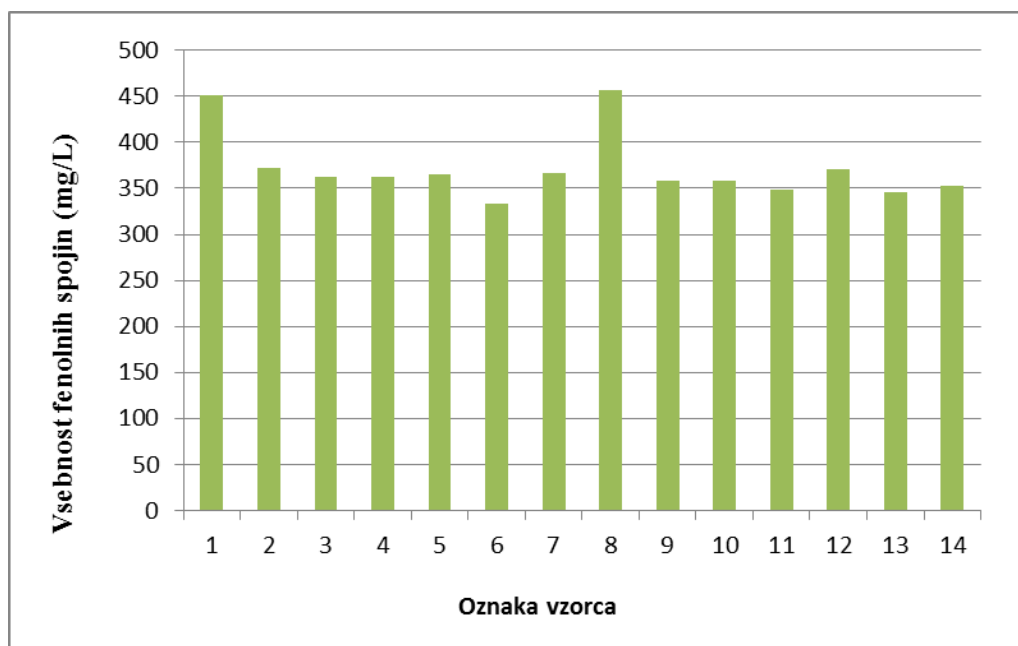
Preglednica 6: Rezultati WineScan analize za vzorce pridelanih mladih vin

Oznaka vzorca	RG (/)	ALK (vol.%)	SSE (g/L)	RS (g/L)	SPE (g/L)	SK (g/L)	HK (g/L)	pH (/)	JabK (g/L)	MleK (g/L)	VinK (g/L)	GLIC (g/L)	CO ₂ (mg/L)	indeks FC
1	1,0311	7,59	96,96	77,60	19,36	5,36	0,36	3,356	2,80	0,14	3,39	2,65	2274,94	17,52
2	0,9922	12,01	21,40	1,76	19,64	5,31	0,348	3,522	0,68	1,15	1,83	6,96	1223,86	9,38
3	0,9920	12,03	21,06	1,50	19,56	5,05	0,349	3,528	0,06	1,44	1,82	7,13	1247,49	8,78
4	0,9922	11,99	21,47	1,46	20,01	5,36	0,517	3,534	0,10	1,85	1,67	7,05	1226,52	10,75
5	0,9937	11,81	24,47	5,14	19,33	5,09	0,632	3,565	0,32	1,40	1,88	7,13	1366,24	10,12
6	0,9933	11,88	23,32	3,11	20,21	6,11	0,605	3,463	2,00	0,33	1,75	7,17	1239,54	7,89
7	0,9932	11,79	23,20	3,85	19,35	5,42	0,937	3,544	0,09	1,76	1,58	7,49	1057,77	10,18
8	1,0369	6,96	108,20	88,79	19,41	5,24	0,417	3,381	2,95	0,28	3,82	1,87	2362,32	16,10
9	0,9925	11,98	21,80	1,51	20,29	6,50	0,319	3,424	2,45	0,23	1,79	7,11	1177,92	9,23
10	0,9924	11,98	21,66	1,23	20,43	6,26	0,311	3,440	1,94	0,42	1,80	7,14	1086,22	7,83
11	0,9921	11,99	21,33	1,51	19,82	5,28	0,530	3,529	0,07	1,80	1,67	6,88	1129,18	10,57
12	0,9942	11,79	25,21	5,30	19,91	6,28	0,562	3,451	2,35	0,23	1,87	6,93	1214,61	8,46
13	0,9931	11,89	22,97	2,37	20,60	6,38	0,583	3,452	2,28	0,20	1,75	7,24	1176,84	8,58
14	0,9928	11,85	22,46	3,09	19,37	5,34	0,907	3,552	0,08	1,78	1,60	7,38	1124,23	10,88

Legenda: RG- relativna gostota, ALK- alkohol, SSE- skupni suhi ekstrakt, RS- reducirajoči sladkorji, SPE- sladkorja prosti ekstrakt, SK- skupne kisline, HK- hlapne kisline, JabK- jabolčna kislina, MleK- mlečna kislina, VinK- vinska kislina, Glic- glicerol, CO₂- topni CO₂, * indeks FC = informativna vrednost

4.3.2 Vsebnost skupnih fenolnih spojin

Fenolne spojine igrajo pomembno vlogo v enologiji, saj prispevajo k barvi ter vplivajo na vonj in okus pridelanega vina. So tudi osnova za staranje vina, delujejo kot antioksidanti ter imajo pozitivne zdravstvene učinke, kajti antioksidativne in bakteriocidne lastnosti fenolnih spojin varujejo potrošnike pred boleznimi srca in ožilja. Za razliko od večine fizikalno kemijskih parametrov mošta oz. vina vsebnost fenolnih spojin v vinu zakonsko ni omejena (Bavčar, 2009; Ribéreau-Gayon in sod., 2000).



Slika 26: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni AF (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

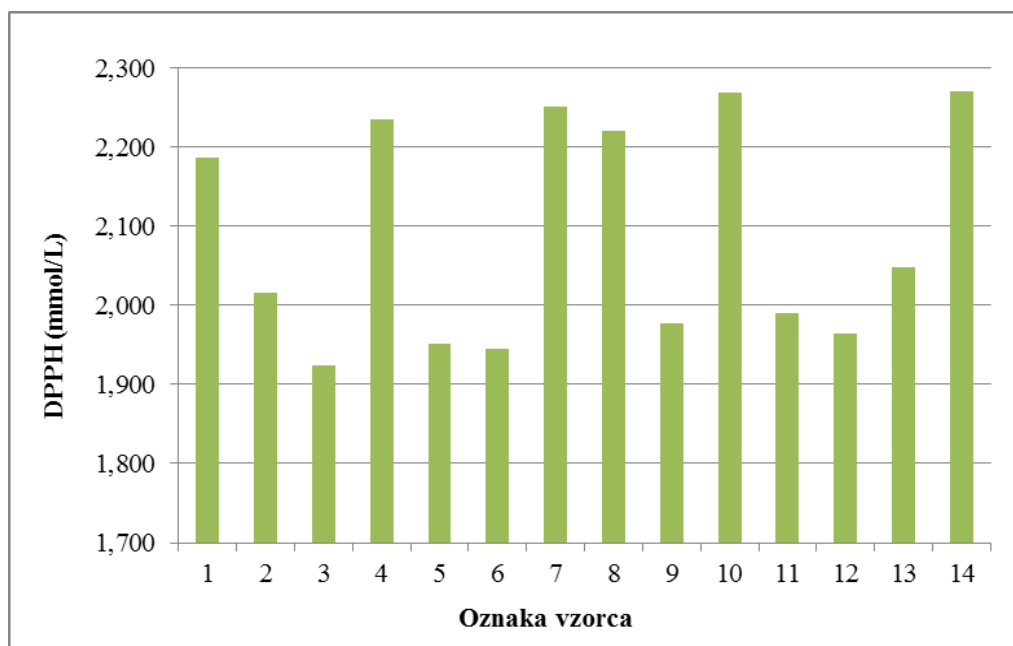
Na sliki 26 so prikazane povprečne koncentracije skupnih fenolnih spojin v vzorcih mladih vin, izražene v mg galne kisline/L vina. Vsak stolpec na sliki prikazuje povprečno vrednost dveh meritev za posamezni vzorec in je razvidno, da vsi vzorci, razen kontrolnih, vsebujejo podobno koncentracijo fenolnih spojin (med 340 in 370 mg/L). Največjo vsebnost skupnih fenolnih snovi smo določili v vzorcih, kjer je potekla spontana alkoholna fermentacija (1 in 8). Pri teh dveh vzorcih so vsebnosti fenolnih spojin neobičajno visoke ($453,7 \pm 2,5$) mg/L, saj navadno fenolne spojine ne presežejo 400 mg/L. Po primerjavi rezultatov, ki smo jih pridobili z analizo WSC (preglednica 6) in rezultatov vsebnosti skupnih fenolnih spojin, lahko zaključimo, da je večja vsebnost fenolov v vzorcih 1 in 8 najverjetneje posledica večje koncentracije reducirajočih sladkorjev ($83,20 \pm 5,60$) g/L. Oba vzorca sta imela tudi najvišji indeks FC in sicer 17,52 oziroma 16,10, v povprečju pa $16,81 \pm 1,00$ (preglednica 6). Kot pravi Abramovič (2011), je slabost Folin-Ciocalteujeve metode pri določanju

skupnih fenolnih spojin ravno ta, da omenjeni reagent reagira nespecifično z vsemi fenolnimi -OH skupinami, tako z aromatskimi aminokislinami, kot tudi z askorbinsko kislino, organskimi kislinami in reducirajočimi sladkorji. Ker je po končani spontani alkoholni fermentaciji v vzorcih ostala visoka vsebnost reducirajočih sladkorjev, predvidevamo, da je ravno to vzrok za večje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih 1 in 8. V povprečju je imel kontrolni vzorec največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin ($453,7 \pm 2,5$) mg/L, najmanjšo vsebnost pa smo določili v vzorcu, kateremu smo dodali kvasovke Uvaferm SLO in hranilo za kvasovke ($340,00 \pm 6,25$) mg/L.

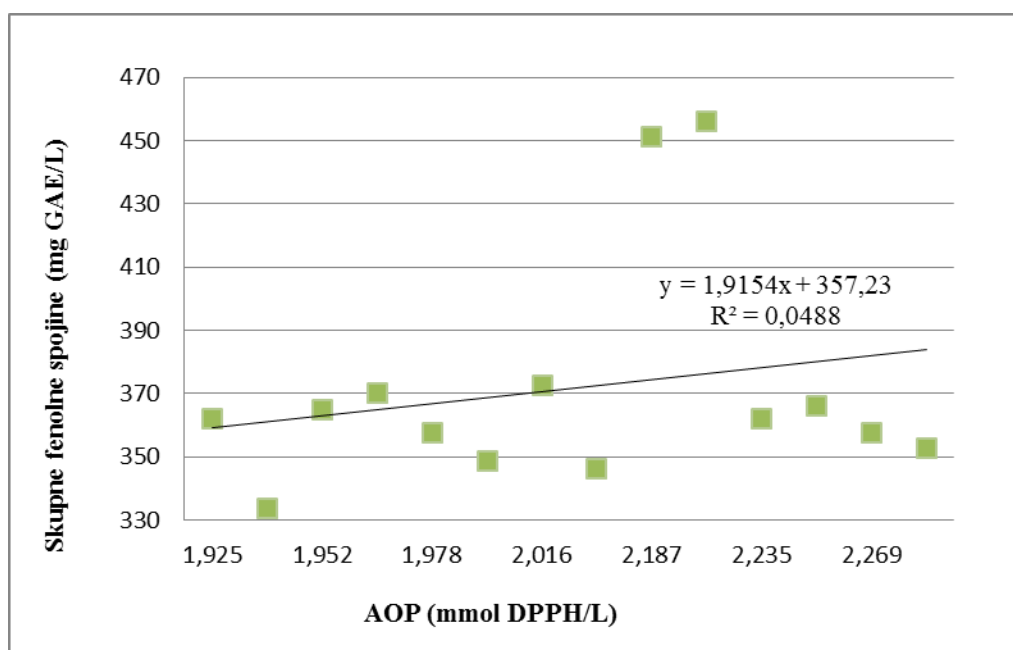
4.3.3 Antioksidativni potencial mladega vina

Ko želimo opisati potencialno antioksidativno učinkovitost neke snovi, uporabimo reaktivne spojine, ki jih lahko pričakujemo v okolju, kjer bi preiskovani antioksidant uporabili (Abramovič, 2011).

Na sliki 27 je prikazana povprečna vrednost antioksidativnega potenciala (AOP) treh meritev. Pričakovati je bilo, da bomo le-te lahko primerjali z meritvami vsebnosti fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo (slika 26), vendar med njimi nismo našli povezave. Vzorec, ki ima največjo vsebnost fenolnih spojin, naj bi imel hkrati tudi največji antioksidativni potencial, saj večji delež inhibicije radikala DPPH pomeni, da je antioksidant bolj učinkovit v lovljenju radikala (Abramovič, 2011). Vrednosti AOP so se gibale med 1,925 (vzorec 3) in 2,271 mmol/L (vzorec 14). Dodatek mlečnokislinskih bakterij v mošt pomembno pripomore k večjemu AOP mladega vina, predvidevamo lahko, da so k redukciji DPPH radikala prispevali tudi antioksidanti mlečnokislinskih bakterij. V povprečju smo najvišji AOP določili vzorcu z dodatkom Lalvin ICV OKAY, hranila in MKB ($2,261 \pm 0,010$) mmol/L ter najmanjšega v vzorcu, kateremu smo dodali Uvaferm SLO in hranilo za kvasovke ($1,997 \pm 0,052$) mmol/L.



Slika 27: AOP (mmol/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni AF (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)



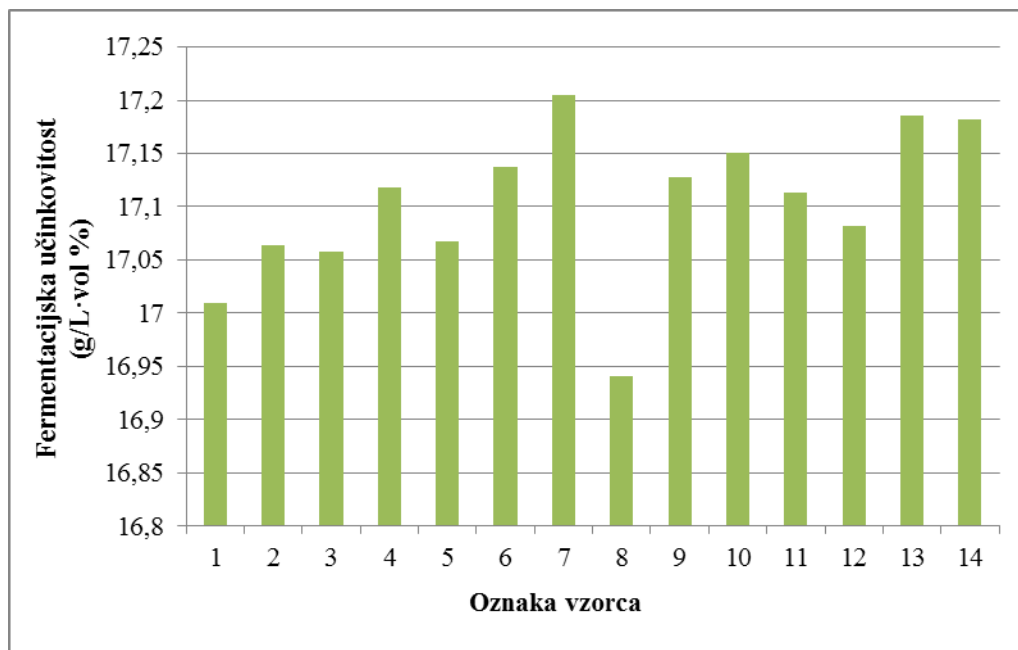
Slika 28: Korelacija vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) in AOP (mmol DPPH/L) vzorcev mladega vina

Proti našim pričakovanjem je zveza med skupnimi fenoli (PFT) in AOP neznačilna. Personov korelacijski koeficient ($R^2=0,0488$) nam pove nizko povezanost. Tudi če ne upoštevamo dveh točk z največjo koncentracijo PFT (spontani AF), ne dobimo boljše povezanosti.

Največji vpliv na precenjeno koncentracijo PFT imajo reducirajoči sladkorji in tudi drugi reducenti (ne-fenolne spojine), ki reagirajo s FC reagentom.

4.3.4 Izračun fermentacijske učinkovitosti

Pri izračunu fermentacijske učinkovitosti smo uporabili podatke o sladkorni stopnji mošta ter podatke o koncentraciji reducirajočih sladkorjev in alkoholni stopnji v pridelanem mlademu vinu, ki smo jih pridobili s pomočjo analize WineScan.



Slika 29: Fermentacijska učinkovitost (g/L·vol %) alkoholne fermentacije (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

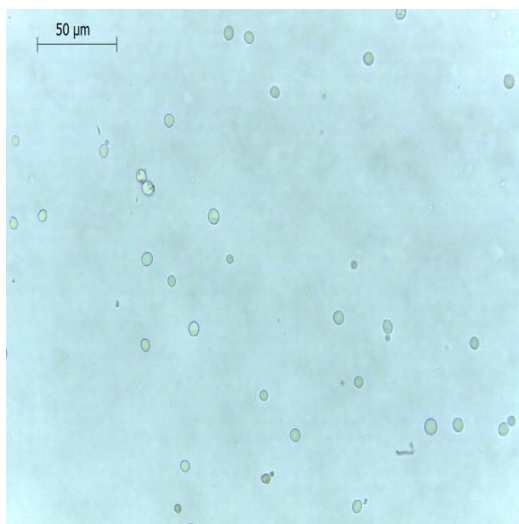
Pričakovano najmanjšo fermentacijsko učinkovitost imata vzorca 1 in 8, pri katerih je potekala spontana alkoholna fermentacija (slika 30). Ta rezultat lahko pripišemo velikemu ostanku reducirajočih sladkorjev v teh dveh vzorcih po končani AF, verjetno pa se je del reducirajočih sladkorjev porabil tudi za tvorbo metabolitov, ne le etanola. Največjo fermentacijsko učinkovitost smo izračunali v vzorcu 7 (17,21 g/L/vol.%). Razlike v fermentacijski učinkovitosti med vsemi vzorci niso velike. Povprečno največjo fermentacijsko učinkovitost smo izračunali v vzorcu z dodatkom kvasovk Lalvin ICV OKAY, hranila in MKB ($17,12 \pm 0,02$ g/L/vol.%), ter najmanjšo v kontrolnem vzorcu ($16,98 \pm 0,04$ g/L·vol %).

4.3.5 Mikroskopiranje kvasnih celic droži

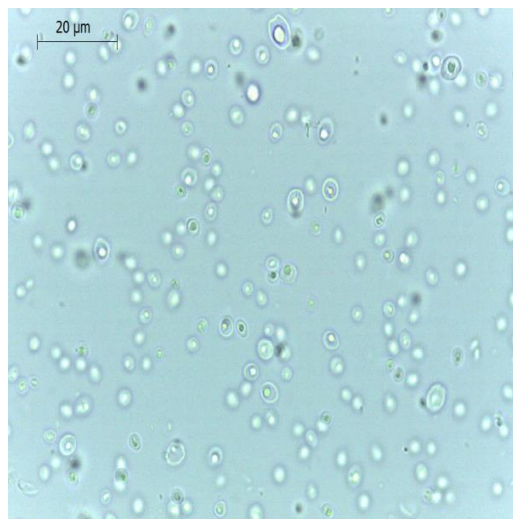
Košmerl (2007) ugotavlja, da so vinske droži delci, kateri ostanejo na dnu posode po zaključeni alkoholni fermentaciji. Sestavlja jih rastlinski material, skupek kristalov

vinskega kamna, izločeni koloidi in v največji meri odmrle kvasne celice. Po zaključku fermentacije le-te predstavljajo 1,5 do 3 % fermentirajočega volumna.

Po zaključku alkoholne fermentacije smo naredili mikroskopske posnetke mikrobnih združbe na drožeh vzorcev vina, nekateri izmed njih so prikazani na slikah 31 do 34.

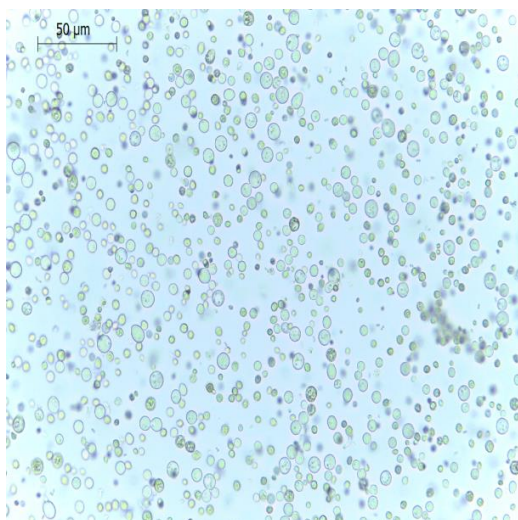


Slika 30: Mikroskopski posnetek droži vzorca 1 (spontana AF) pri 400-kratni povečavi

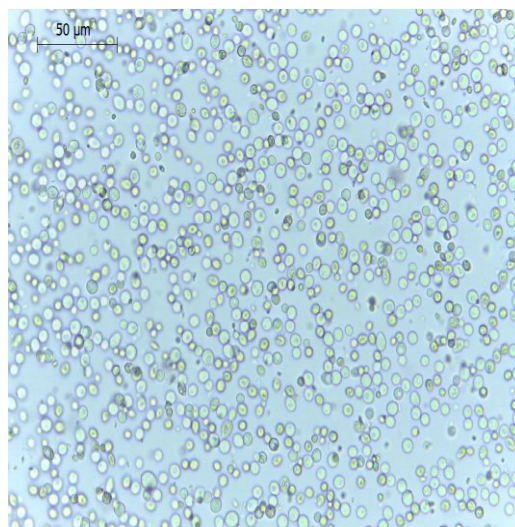


Slika 31: Mikroskopski posnetek droži vzorca 2 (kvasovka Lalvin ICV OKAY) pri 400-kratni povečavi

Slika 30 prikazuje vinske kvasovke na drožeh v vzorcu 1, pri katerem je potekala spontana AF z endogeno mikrobioto, kjer vidimo majhno število kvasnih celic. Na sliki 31 vidimo kvasne celice v drožeh vzorca 2, kateremu smo dodali komercialni sev kvasovk. Na sliki 32 so vidne kvasne celice iz vzorca, kateremu je bila poleg vinskih kvasovk, dodana še hrana za kvasovke. Slika 33 pa nam prikazuje vinske kvasovke na drožeh po končani AF, ki je potekala s pomočjo komercialnih kvasovk, hranil za kvasovke in mlečnokislinskih bakterij. Na slikah so posnetki kvasnih celic le določenega seva komercialnih kvasovk, saj se droži druge paralelke niso bistveno razlikovale.



Slika 32: Mikroskopski posnetek droži vzorca 3 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo) pri 400-kratni povečavi



Slika 33: Mikroskopski posnetek droži vzorca 4 (kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB) pri 400-kratni povečavi

4.3.6 Rezultati senzoričnih analiz mladega vina

Po končani alkoholni fermentaciji smo vzorce senzorično ocenili po 20-točkovnem sistemu po Buxbaumu, z metodo hitrega profiliranja (Flash profiling), z ocenjevanjem všečnosti z 9-točkovno hedonsko lestvico in z ocenjevanjem arome vina z metodo CATA (Check All That Apply). V ocenjevalni komisiji so bili trije ocenjevalci.

- Buxbaumova metoda ocenjevanja

Bistrost

Bistrosti mladega vina nismo ocenjevali, zato smo vsem vzorcem dodelili po 2,0 točki.

Barva

Nagibanje kozarca pod kotom ima prednost pri ustvarjanju gradacije oz. stopnje barvne globine vina. Glede na barvo lahko bela vina opišemo kot rumenkasta, zelena, slamnata, zlata ali jantarna; glede na intenzivnost barve je belo vino lahko blede, vodeno, srednje ali intenzivno (Košmerl, 2005). Barvo vseh vzorcev mladih vin smo ocenili z 2,0 točke.

Vonj

Vonj vina ocenjujemo na tak način, da povohamo vino najprej v mirujočem kozarcu, predno ga zavrtimo, pri tem moramo biti pozorni predvsem na vrsto in intenzivnost vonjev. Nato zavrtimo kozarec in s tem pospešimo sproščanje aromatičnih sestavin, vino povohamo z nosom globlje v kozarcu ter primerjamo vrsto in intenzivnost vonjav v primerjavi s prvo zaznavo. Intenzivnost vonja je lahko šibka, srednja ali izražena (Košmerl, 2005).

Najvišjo oceno vonja smo pripisali vzorcem 3, 5 ter 14 in je znašala 3,3 točke. Pri večini vzorcev je bilo zaznati rahle reduktivne note, ki pa so po vrtenju kozarca navadno izginile. Najslabši oceni vonja smo pripisali vzorcema 10 in 11, saj je bilo v njiju moč vonjati SO₂ in reduktivno noto vonja. Največ sadnih vonjev smo zaznali pri vzorcih 3, 4 in 13.

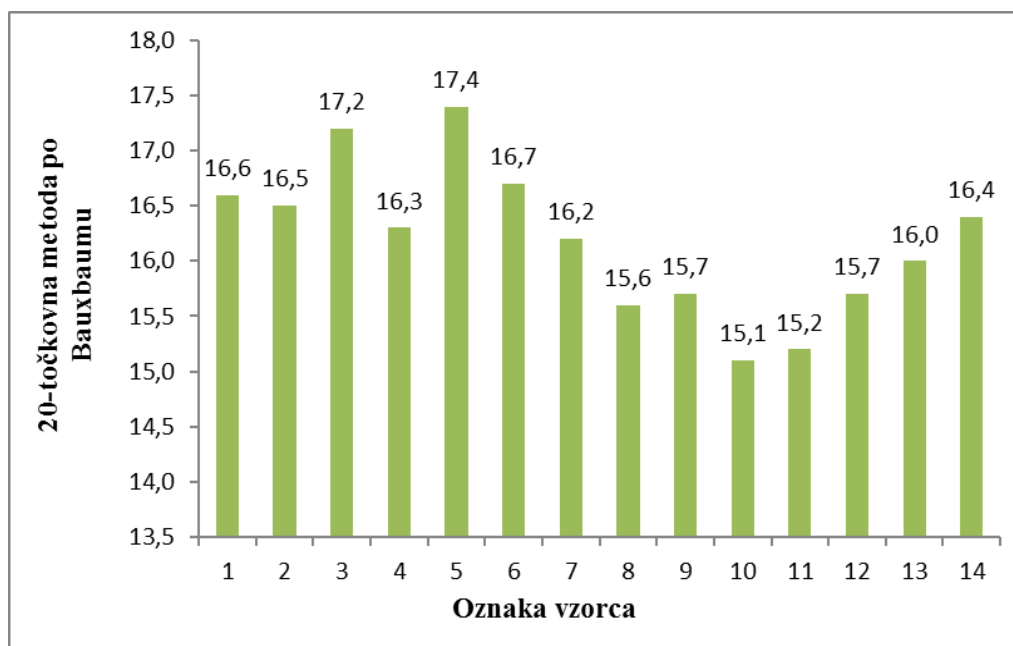
Okus

Okus zaznamo pri okušanju manjše količine (6-10 mL) vina v ustih. Sledi gibanje vina, s katerim prekrijemo ustno votlino v celoti. Pozorni moramo biti na časovni pojav zaznav posameznega okusa (sladko, kislo, grenko), trajanje zaznave, njene obstojnosti ter na spremembe v zaznavi in intenzivnosti okusa. Temu sledi taktilna ali tipna zaznava trpkosti (astringence), zbadanje ali pikanje (npr. prisotnost CO₂), polnost, ekstraktnost, temperatura in toplota vina. Kot posledica višje temperature v ustih, se v tej fazi ponovno pojavi zaznava vonja vina, pri čemer smo pozorni predvsem na vrsto, razvoj in trajanje intenzivnosti vonjav. Nato ocenimo še pookus vina, to je vonj, ki ga zaznamo, ko po 15-30 sekundah vdihnemo zrak v pljuča (hlape vina), popijemo ali izpljunemo ter izdahnemo ogrete hlape skozi nos (Košmerl, 2005).

Najbolj poln in harmoničen okus smo zaznali pri vzorcu 5, katerega smo ocenili s 5,1 točke. S 4,9 točke mu sledita vzorca 4 in 14, ki sta aromatičnega in sadnega okusa. Najslabše smo okus ocenili v vzorcih 6, 8, 10 in 11 s 4,4 točke. V teh vinih prevladuje izrazito prazen, grenek in trpek okus.

Harmonija

Glede na splošni vtis ocenimo vino še s harmoničnostjo, ki je skupek vseh parametrov. Za najbolj harmonično vino smo ocenili vzorec 5 s 5,0 točke, sledi mu vzorec 3, najmanj harmonični vini pa sta vzorca 10 in 11 (4,2 točke).



Slika 34: Skupna ocena senzoričnega ocenjevanja mladih vin po Buxbaumu (1 in 8- spontana AF; 2 in 9- kvasovka Lalvin ICV OKAY; 3 in 10- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo; 4 in 11- kvasovka Lalvin ICV OKAY + hranilo + MKB; 5 in 12- kvasovka Uvaferm SLO; 6 in 13- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo; 7 in 14- kvasovka Uvaferm SLO + hranilo + MKB)

Skupne ocene senzoričnega ocenjevanja po 20-točkovnem sistemu po Buxbaumu smo prikazali na sliki 34. Najvišjo oceno je prejelo mlado vino z oznako vzorca 5, s 17,4 točke. To vino je intenzivnega in prijetnega vonja, z izrazito sadno in cvetlično aromo, prijetnega in harmoničnega okusa. Najnižje smo ocenili vino, vzorca 10, s 15,1 točke, pri katerem smo zaznali fermentacijsko aromo in vonj po H_2S ; vino je trpkega okusa, s pomanjkanjem sadnosti.

- Hitro profiliranje

Prvi opisnik, ki smo ga zaznali v mladih vinih je sladkost, za katerega smo vzorce 2, 10, 11 in 14 ocenili kot najmanj sladka, ob tem smo vzorca 1 in 8 ocenili, kot najbolj sladka. Najmanjšo sadnost sta imela vzorca 2 in 10, medtem ko smo ocenili, da ima vzorec 5 največjo sadnost. Vzorcema 7 in 14 smo določili najmanjšo kislost, vzorec 11 pa je bil najbolj kisel. Najmanjšo trpkost smo zaznali v vzorcih 4 in 5, medtem ko smo največjo ocenili vzorcema 11 in 14. Najmanj izrazito aromo po hruški je imel vzorec 5, najbolj pa vzorec 8. Aromo po zelenem sta imela najmanj izrazito vzorca 8 in 9, rahlo večjo je imel vzorec 11. Najmanjšo grenkobo smo zaznali pri vzorcih 4, 7 in 9, medtem ko sta bila najbolj grenka vzorca 11 in 12. Najmanjšo reduktivno aromo smo ocenili v vzorcu 13, najbolj reduktivno aromo pa je imel vzorec 10. Arome po maslu je bilo najmanj zaznati v vzorcih 3 in 13, najbolj pa v vzorcu 12. Vzorca 3 in 14 sta imela najmanj izrazito aromo po dimu, medtem ko je bila ta v vzorcu 6 najbolj izrazita.

- Ocenjevanje arome vina z metodo CATA

S to senzorično metodo označimo vse opise arome, ki veljajo za posamezni vzorec mladega vina in so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: Prikaz opisa arome in vzorcev, ki pripadajo določeni senzorični lastnosti, po metodi CATA

Opis arome	Oznaka vzorcev, za katere veljajo določeni opisi arome
po marelici	3 9 14
po akaciji	4 6 7 8 9 12 13 14
po ananasu	5 7
po glogu	4 13
po banani	3 4 5 8
po citrusih	3 4 5 7 9 13 14
po kutini	2 4 10 11
po tropskem sadju	5 7
po muškatu	3 5
po senu	2 3 7 9 12 13 14
po maslu	2 6 7 10 11 12 13 14
po medu	4 10 11 12 13 14
po lešnikih/orehih	3 7 8 9 10 11 12
po jabolki	1 4 8 9 10 11
po hruški	1 5 8 10 13
po lipi	3 6 8 9 10 14
po mošusu	
po zeliščih	2 5 6 9 10 13 14
po suhem sadju	
plehka, prazna aroma	6
srednje intenzivna aroma	1 2 3 5 6 7 8 9 10 12 13 14
neprijetna aroma	4 8 9 10 11 12

S to metodo smo ocenili, da so v pridelanih mladih vinih najpogostejše zastopane arome po akaciji, citrusih, senu, maslu, medu, lešnikih/orehih, jabolki, hruški, lipi ter po zeliščih. Za največ (12) vzorcev smo se odločili, da so srednje intenzivne arome, 6-tim pa smo ocenili neprijetno aromo. Za najbolj aromatična vina smo določili vzorce 3, 4, 10, 13 in 14. Iz tega lahko sklepamo, da so imele na senzorično kakovost vina večji vpliv kvasovke seva Lalvin ICV OKAY v primerjavi s kvasovkami seva Uvaferm SLO. V vinih z dodatkom hranila RESKUE in MKB Lallemmand OMEGA smo prav tako določili boljšo aromatiko.

▪ Ocenjevanje všečnosti z 9-točkovno hedonsko lestvico

Vzorci smo ocenjevali z lestvico ugajanja, ki ima naslednjih 9 opisnikov všečnosti: ekstremno ne ugaja, zelo ne ugaja, dokaj ne ugaja, rahlo ne ugaja, niti ugaja niti ne ugaja, rahlo ugaja, dokaj ugaja, zelo ugaja in ekstremno ugaja. Naši trije ocenjevalci so podali naslednje rezultate:

- vzorec 1: rahlo ugaja, dokaj ugaja (2x);
- vzorec 2: zelo ne ugaja, rahlo neugaja, rahlo ugaja;
- vzorec 3: zelo ne ugaja, dokaj ugaja (2x);
- vzorec 4: niti ugaja niti ne ugaja, rahlo ugaja, dokaj ugaja;
- vzorec 5: rahlo ugaja, zelo ugaja (2x);
- vzorec 6: niti ugaja niti ne ugaja (2x), zelo ugaja;
- vzorec 7: rahlo ugaja, dokaj ugaja (2x);
- vzorec 8: rahlo ne ugaja, niti ugaja niti ne ugaja (2x);
- vzorec 9: dokaj ne ugaja, niti ugaja niti ne ugaja, dokaj ugaja;
- vzorec 10: dokaj ne ugaja, rahlo ne ugaja, rahlo ugaja;
- vzorec 11: dokaj ne ugaja, niti ugaja niti ne ugaja, rahlo ugaja;
- vzorec 12: niti ugaja niti ne ugaja, rahlo ugaja, dokaj ugaja;
- vzorec 13: rahlo ugaja, dokaj ugaja (2x);
- vzorec 14: rahlo ugaja, dokaj ugaja (2x).

5 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov pri pridelavi mladega vina sorte sauvignon z dvema različnima komercialnima sevoma kvasovk, hranila za kvasovke in dodatkom mlečnokislinskih bakterij, lahko potrdimo naslednje delovne hipoteze:

- Uporabljene kombinacije dveh sevov kvasovk, hranila za kvasovke in dodatek mlečnokislinskih bakterij vplivajo na fermentacijsko kinetiko in fizikalno-kemijske parametre vina, v manjši meri pa tudi na njegove senzorične lastnosti.
- Kvasovke so ob dodatku hranil za kvasovke imele boljšo sposobnost pretvorbe sladkorjev v etanol, v primerjavi s tistimi, kjer hranil moštu nismo dodali, kar je razvidno tudi iz izračuna fermentacijske učinkovitosti.
- Dodatek mlečnokislinskih bakterij v mošt ni značilno vplival na aktivnost vinskih kvasovk, saj so le-te kljub njihovi prisotnosti nemoteno opravljale svojo funkcijo alkoholne fermentacije.
- Dodane mlečnokislinske bakterije skupaj s kvasovkami in hranilom za kvasovke so praktično v celoti pretvorile jabolčno kislino v mlečno.
- Dodatek mlečnokislinskih bakterij v mošt je pomembno pripomogel k večjemu antioksidativnemu potencialu mladega vina, zato lahko predvidevamo, da so k redukciji prostega radikala DPPH prispevali tudi produkti metabolizma mlečnokislinskih bakterij.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bilo spremljati potek alkoholne fermentacije mošta z inokulacijo komercialnih sevov vinskih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* samostojno in v kombinaciji s hranili za kvasovke ter mlečnokislinskimi bakterijami. Ugotoviti smo želeli značilne razlike v poteku alkoholne fermentacije, vpliv različnih dodatkov na alkoholno fermentacijo, na fizikalno-kemijske parametre in na senzorično kakovost mladega vina. Potek alkoholne fermentacije skupno 14-ih vzorcev bele vinske sorte sauvignon smo periodično spremljali gravimetrično s tehtanjem fermentacijskih steklenic in posledično z oddajanjem ogljikovega dioksida tekom alkoholne fermentacije. Na podlagi dobljenih podatkov smo izrisali fermentacijske krivulje in krivulje kemijske kinetike.

V kontrolnem vzorcu je potekala spontana alkoholna fermentacija z endogeno mikrobioto, medtem ko smo v ostalih vzorcih alkoholno fermentacijo spodbudili z dvema različnima vrstama selekcioniranih kvasovk, ob dodatku hranil in mlečnokislinskih bakterij. Fermentacijski poskus je potekal v dveh ponovitvah. Po zaključeni alkoholni fermentaciji smo opravili fizikalno-kemijske in senzorične analize mladega vina ter mikroskopski pregled droži. S pridobljenimi rezultati smo ugotovili, da ima dodatek različnih starterskih kultur vpliv na značilnosti pridelanega mladega vina, predvsem na fermentacijske in tehnološke lastnosti, medtem ko na senzorične karakteristike v manjši meri.

Vsi dobljeni rezultati fermentacijskih krivulj in krivulj fermentacijske kinetike so potrdili, da se z dodatkom starterskih kultur kvasovk, mlečnokislinskih bakterij in hranil za kvasovke bistveno skrajša faza prilagajanja kvasovk, posledično je hitrejši in učinkovitejši začetek alkoholne fermentacije, v primerjavi s kontrolnimi vzorci, pri katerih je potekala spontana alkoholna fermentacija z endogeno mikrobioto. Pri pridelavi vina je ravno zaradi hitrejšega začetka alkoholne fermentacije zaželeno čim krajša faza prilagajanja kvasovk. Daljša faza prilagajanja kvasovk in nezadostna pretvorba sladkorja v etanol, sta namreč le dve izmed neželenih lastnosti naravno prisotne mikrobiote mošta in ta se običajno nahaja tudi v zelo majhnem številu.

Do sedaj že ugotovljeno korelacijo med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativnim potencialom vina v naši raziskavi nismo mogli z gotovostjo potrditi, saj Folin-Ciocalteu reagent nespecifično reagira z vsemi fenolnimi -OH skupinami, zato smo dobili lažno previsoke vsebnosti fenolnih spojin v nekaterih vzorcih. Največjo izmerjeno vsebnost fenolnih spojin smo določili v kontrolnih vzorcih, pri katerih je potekala spontana alkoholna fermentacija. Ker le-ta ni potekla v celoti, so v mladem vinu preostale večje koncentracije reducirajočih sladkorjev, kateri so reagirali s FC reagentom in tako prispevali k lažno večji vsebnosti fenolnih spojin. Dodatek mlečnokislinskih bakterij v mošt pomembno pripomore k večjemu antioksidativnemu potencialu mladega vina,

predvidevamo lahko, da so k redukciji DPPH radikala prispevali tudi produkti metabolizma mlečnokislinskih bakterij.

Povečana koncentracija sladkorjev v vinu, ki je posledica nedokončane alkoholne fermentacije v kontrolnih vzorcih, vpliva na njuno večjo relativno gostoto. Ker so te vrednosti ostalih vzorcev med seboj primerljive in znašajo okoli 0,99, ne moremo trditi, da so kakšne bistvene razlike v relativni gostoti vina, če moštu dodamo kvasovke Lalvin ICV OKAY ali Uvaferm SLO, prav tako dodatek hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemund OMEGA ne vplivata na relativno gostoto mladih vin.

Ker je v kontrolnih vzorcih potekala spontana AF, sta ta imela manjšo alkoholno stopnjo kot ostali, na račun že prej omenjene večje vsebnosti reducirajočih sladkorjev. Vzrok za to je v počasnem in neoptimalnem delovanju endogene mikrobiote v moštu, katera ni uspela v celoti pretvoriti sladkorjev v etanol. Vsi ostali vzorci so dosegli približno enake povprečne alkoholne stopnje, in sicer okoli 12 vol.%. Lahko trdimo, da so komercialne kvasovke Lalvin ICV OKAY v povprečju tvorile za 0,2 vol.% več alkohola kot Uvaferm SLO in da dodatek hranil za kvasovke v našem primeru ni vplival na količino nastalega alkohola, kot je to bilo pričakovati. Prav tako na količino nastalega etanola ni vplival dodatek mlečnokislinskih bakterij, kar je bilo na njihov metabolizem tudi pričakovano.

V povprečju je bilo skupnega suhega ekstrakta v mladih vinih med 21 in 25 g/L. Tudi tukaj sta ponovno izjemi kontrolna vzorca, saj je njuna vsebnost petkrat večja glede na inokulirane vzorce, zopet na račun visoke vsebnosti reducirajočih sladkorjev v mladem vinu. Lahko rečemo, da so kvasovke Uvaferm SLO na račun reducirajočih sladkorjev v povprečju tvorile za 3 g/L več skupnega suhega ekstrakta kot kvasovke Lalvin ICV OKAY. Dodatek hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemund OMEGA sta povzročila malenkost manjšo vsebnost skupnega suhega ekstrakta, kot če ju vzorcem nismo dodali.

Največjo vsebnost reducirajočih sladkorjev smo določili v kontrolnih vzorcih, kot je bilo tudi pričakovati, zaradi počasne in nekontrolirane fermentacije, saj se sladkor v moštu ni v celoti pretvoril v etanol. Ostali vzorci so imeli med seboj primerljivejše koncentracije reducirajočih sladkorjev, kateri so bili med 2 in 5 g/L. Ugotovili smo, da je bil s pomočjo kvasovk Lalvin ICV OKAY dvakrat manjši preostanek reducirajočih sladkorjev v vzorcih, kakor pri tistih, katerim smo dodali komercialne kvasovke Uvaferm SLO. Največ sladkorjev se je po pričakovanjih porabilo v vzorcih, katerim smo poleg kvasovk dodali tudi hranilo za kvasovke, medtem ko je bil preostanek reducirajočih sladkorjev v vzorcih s hranilom za kvasovke in mlečnokislinskimi bakterijami malenkost večji.

Ugotovili smo, da ne moremo z gotovostjo trditi, katera vrsta kvasovk je odgovorna za večje vsebnosti sladkorja prostega ekstrakta, tudi vpliva hranila za kvasovke in mlečnokislinskih bakterij na njegovo vsebnost ne moremo natančno določiti, saj se povprečne vsebnosti med vzorci bistveno ne razlikujejo.

Če primerjamo koncentracije skupnih kislin v moštu pred alkoholno fermentacijo, lahko opazimo, da so se v mladih vinih le-te še nekoliko povečale. Tako je koncentracija skupnih kislin v vseh vzorcih mladih vin večja kakor v moštu, kar je najverjetneje posledica tvorbe novih kislin v ciklusu trikarboksilnih kislin. Kvasovke Uvaferm SLO so v primerjavi s kvasovkami Lalvin ICV OKAY med fermentacijo tvorile več skupnih kislin, medtem ko je v obeh primerih dodatek mlečnokislinskih bakterij zmanjšal njihovo nastajanje.

Vsebnosti hlapnih kislin so bile večje v vzorcih z dodatkom kvasovke Uvaferm SLO kot pri kvasovkah Lalvin ICV OKAY. Dodatek mlečnokislinskih bakterij je močno povečal vsebnosti hlapnih kislin v vseh vzorcih, saj le-te z razgradno jabolčne (lahko pa tudi citronske) kisline med biološkim razkissom tvorijo poleg mlečne kisline tudi manjše koncentracije očetne kisline.

V našem primeru ne opazimo kakšne bistvene razlike v vrednosti pH, če dodamo različni vrsti komercialnih vinskih kvasovk. Povišano vrednost pH je bilo pričakovano očitno zaznati pri dodatku mlečnokislinskih bakterij v vzorec, saj le-te pretvorijo jabolčno kislino v mlečno, zmanjšanje kislin pa je nato posledično odgovorno za dvig vrednosti pH. Ob dodatku hranil za kvasovke nismo zaznali nobene povezave z očitno spremembo v vrednosti pH.

Tako kot smo pričakovali, je bila koncentracija jabolčne kisline občutno najmanjša v tistih vzorcih, katerim so bile dodane mlečnokislinske bakterije, kar je posledica poteka jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. Razlik v količini jabolčne kisline med dodatkom obeh vrst kvasovk in hranila za kvasovke ni bilo zaznati.

Daleč največ mlečne kisline je nastalo v vzorcih, katerim smo dodali mlečnokislinske bakterije, ki so omogočile potek jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. Ti rezultati so v skladu z našimi pričakovanji, posledično je v teh vzorcih koncentracija jabolčne kisline najmanjša. Razlike v količini mlečne kisline v vinu nismo zaznali ob dodatku obeh vrst vinskih kvasovk. Prav tako na koncentracijo mlečne kisline ne vpliva dodatek hranil za kvasovke.

Ob dodatku obeh vrst vinskih kvasovk Lalvin ICV OKAY in Uvaferm SLO ni bilo opaziti razlike v vsebnosti vinske kisline v vzorcih pridelanih mladih vin. Nekoliko so bile vsebnosti vinske kisline manjše ob dodatku hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemund OMEGA v primerjavi z vzorci, kjer le-teh nismo dodali.

7 VIRI

- Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti: učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Bartowsky E., Costello P., Krieger-Weber S., Markides A., Francis L., Travis B. 2010. Influence of malolactic fermentation on the fruity characters of red wines- bringing wine chemistry and sensory together. Adelaide, The Australian Wine Research Institute: 9 str.
- Bavčar D. 2009. Kletarjenje danes. 2. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 295 str.
- Berthels N.J., Cordero Otero R.R., Bauer F.F., Thevelein J.M., Pretorius I.S. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. FEMS Yeast Research, 4: 683-689
- Blašković Z. 1978. Kemična analiza vina sorte Rebula s posebnim poudarkom na sestavo organskih kislin. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Živilsko-tehnološki oddelek: 5-19
- Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunee R.E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, The Chapman & Hall Enology Library: 35-181
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT/ Food Science and Technology, 28: 25-30
- Fleet G.H., Heard G.M. 1992. Yeasts: growth during fermentation. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 27-54
- Fleet G.H. 2002. Wine microbiology and biotechnology. London, Taylor & Francis: 289-420
- Fleet G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86: 11-22
- FOSS. 2014. WineScan™ flaxdatasheet. Hillerød, FOSS: 2 str.
<http://www.foss.dk/industry-solution/products/winescan-so2> (september 2016)
- Garoglio P.G. 1981. Nuova enologia enciclopedia vitivinicola mondiale. Brescia, AEB S.p.A.: 692 str.
- Henschke P.A., Jiranek V. 1992. Yeasts: Metabolism of nitrogen compounds. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 77-164
- Jackson R.S. 2008. Wine science: principles and applications. 3rd ed. Amsterdam, Academic Press: 751 str.
- Johnson H., Robinson J. 2003. Atlante mondiale dei vini. 2^a ed. Milano, Mondadori editore S.p.A.: 352 str.

- Kastelec B. 2001. Spremljanje populacije kvasovk med fermentacijo mošta Kraljevine. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 6-10
- Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann, Rauhut D., Toit M. 2010. Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wine. *Food Science and Technology*, 44, 10: 2077-2086
- Košmerl T. 2003. Vinske kvasovke in njihova vloga med alkoholno fermentacijo. Študijsko gradivo za predavanja iz predmeta Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 2-64
- Košmerl T. 2005. Senzorične lastnosti mošta in vina: študijsko gradivo za pokuševalce vina, mošta in drugih proizvodov iz grozdja in vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.
- Košmerl T., Rački M., Cigić B. 2005. Zveza med antioksidacijskim potencialom vina in vsebnostjo fenolnih spojin. V: Slovenski kemijski dnevi 2005, Maribor, 22. in 23. september 2005. Glavič P., Brodnjak-Vončina D. (ur.). Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 1-10
- Košmerl T. 2007. Alkoholna fermentacija mošta: izbrana poglavja pri predmetu tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.
- Košmerl T., Kač M. 2007. Osnovne kemijske analize mošta in vina: Laboratorijske vaje za predmet tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.
- Košmerl T. 2013. Vinske kvasovke, hranila in tanini. Maribor, Jurana d.o.o.: 67 str.
- Lallemant. 2010. Selekcionirano iz narave. Maribor, Jurana d.o.o.: 12 str.
- Lallemant. 2012. Nutrients. Toulouse, Lallemant Corporation: 7 str.
http://www.lallemantwine.us/products/nutrient_strains.php (avgust, 2016)
- Milek M. 2001. Vpliv kemijske sestave grozdnega soka kultivarja Beli pinot in Sauvignon na kakovost vina. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-44
- Molina A.M., Guadalupe V., Varela C., Swiegers J.H., Pretorius I.S., Agosin E. 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. *Food Chemistry*, 117, 2: 189-195
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219
- Moriera J. L., Santos L. 2004. Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 513: 263-268
- Muhar S.U., Košmerl T. 2005. Izboljšanje kakovosti vina malvazija in teran. V: Vinarski dan, Ljubljana, 14. april 2005. Marinček L. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 25-48

- Patel S., Shibamoto T. 2002. Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5649-5653
- Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja mošta, vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857-3862
- Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za predelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5336-5357
- Pretorius I.S. 2002. Vinske kvasovke za tretje tisočletje: sodobni pristopi k starodavni umetnosti vinarstva. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije v proizvodnji vina. Raspor P. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-12
- Pretorius I. S., Varela C., Kutyna C., Henschke P. A., Chambers P. J., Herderich M. J., 2008. Taking control of alcohol. *Wine Industry Journal*, 23, 6: 41-43
- Podlogar A. 2007. Ohranjanje antioksidativnih lastnosti rdečih vin. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77 str.
- Povhe-Jemec K. 2003. Mikrobna združba v moštu malvazije in njen vpliv na potek alkoholne fermentacije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 3-4
- Radovanović V. 1986. Tehnologija vina. Beograd, Građevinska knjiga: 686 str.
- Raspor P. 1996. Kvasovke. V: Biotehnologija: osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA: 69-93
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donéche B., Lonvaud A. 2000a. Handbook of enology. Vol. 1. The microbiology of wine and vinifications. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: 1-79
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2000b. Handbook of enology. Vol. 2. The chemistry of wine stabilization and treatments. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: 4-269
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 169-180
- Scott. 2010. Fermentation nutrients. Petaluma, Scott Laboratories Inc.: 3 str.
<http://www.scottlab.com/product-433.aspx> (september, 2016)
- Skvarč T. 2007. Določanje glavnih sestavin in parametrov kakovosti v vinih. Diplomska naloga strokovnega študijskega programa. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 29-32
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo od grozdja do vina. Ljubljana, Kmečki glas: 284 str.
- Taks M. 2000. Spremljanje dozorevanja grozdja kultivarja Laški rizling v vinorodni deželi Podravje. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-11
- Vodovnik A., Vodovnik T. 1999. Nasveti za vinarje. Ljubljana, Kmečki glas: 80-80

- Vrščaj Vodošek T. 2007. Vpliv sorte, letnika in dodatka starterske kulture v mošt ali vino na potek jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 5-8
- Würdig G., Woller D. 1989. Chemie des Weines. Stuttgart, Ulmer: 926 str.
- Zapparoli G., Tosi E., Azzolini M., Vagnoli P., Krieger S. 2008. Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines. South African Journal of Enology & Viticulture, 30, 1: 49-55

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se želela zahvaliti mentorici prof. dr. Tatjani Košmerl za strokovno pomoč, potrpežljivost in vložen trud pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala somentorici dr. Petri Terpinc za nasvete in temeljit pregled diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem recenzentki doc. dr. Neži Čadež za pregled diplomskega dela.

Za potrpežljivost in pomoč pri laboratorijskem delu lepa hvala ge. Zdenki Zupančič.

Zahvaljujem se ge. Barbari Slemenik, iz Knjižnice Oddelka za živilstvo, za pomoč pri urejanju diplomske naloge.

Posebna zahvala gre moji družini, predvsem staršem, ker so mi omogočili študij, me ves čas podpirali in bodrili. Hvala sestri Janji za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Najlepše se zahvaljujem Primoževim staršem in bratu pri varstvu otroka v času nastajanja diplomskega dela.

Posebno zahvalo dolgujem mojemu Primožu, ker mi je v času zaključevanja študija stal ob strani, me vzpodbujal in verjel vame. Nenazadnje hvala tudi sinčku Jakobu za potrpežljivo prenašanje moje odsotnosti.

Iskrena hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca 1 in 8 pri spontani alkoholni fermentaciji

parametri/ oznaka vzorca	1	8	povpr. vrednost	σ (SD)
relativna gostota (/)	1,0311	1,0369	1,0340	0,0029
alkohol (vol. %)	7,59	6,96	7,28	0,32
skupni suhi ekstrakt (g/L)	96,96	108,20	102,58	5,62
reducirajoči sladkorji (g/L)	77,60	88,79	83,20	5,60
sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	19,36	19,41	19,39	0,03
skupne kisline (g/L)	5,36	5,24	5,30	0,06
hlapne kisline (g/L)	0,36	0,42	0,39	0,03
vrednost pH	3,36	3,38	3,37	0,01
jabolčna kislina (g/L)	2,80	2,95	2,88	0,08
mlečna kislina (g/L)	0,14	0,28	0,21	0,07
vinska kislina (g/L)	3,39	3,82	3,61	0,22
glicerol (g/L)	2,65	1,87	2,26	0,39
skupne fenolne spojine (mg/L)	451,2	456,2	453,7	2,5
antioksidativni potencial (mmol/L)	2,187	2,222	2,205	0,018
fermentacijska učinkovitost (g/L·vol %)	17,01	16,94	16,98	0,04

Priloga B: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Lalvin ICV OKAY

parametri/ oznaka vzorca	2	9	povpr. vrednost	σ (SD)
relativna gostota (/)	0,9922	0,9925	0,9924	0,0002
alkohol (vol. %)	12,01	11,98	12,00	0,00
skupni suhi ekstrakt (g/L)	21,40	21,80	21,60	0,20
reducirajoči sladkorji (g/L)	1,76	1,51	1,64	0,13
sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	19,64	20,29	19,97	0,33
skupne kisline (g/L)	5,31	6,50	5,91	0,60
hlapne kisline (g/L)	0,35	0,32	0,33	0,01
vrednost pH	3,52	3,42	3,47	0,05
jabolčna kislina (g/L)	0,68	2,45	1,57	0,89
mlečna kislina (g/L)	1,15	0,23	0,69	0,46
vinska kislina (g/L)	1,83	1,79	1,81	0,02
glicerol (g/L)	6,96	7,11	7,04	0,08
skupne fenolne spojine (mg/L)	372,7	357,7	365,2	7,5
antioksidativni potencial (mmol/L)	2,016	1,978	1,997	0,019
fermentacijska učinkovitost (g/L·vol %)	17,06	17,13	17,10	0,04

Priloga C: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Lalvin ICV OKAY in hranila za kvasovke RESKUE

parametri/ oznaka vzorca	3	10	povpr. vrednost	σ (SD)
relativna gostota (/)	0,992	0,9924	0,9922	0,0002
alkohol (vol.%)	12,03	11,98	12,01	0,03
skupni suhi ekstrakt (g/L)	21,06	21,66	21,36	0,30
reducirajoči sladkorji (g/L)	1,50	1,23	1,37	0,14
sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	19,56	20,43	20,00	0,44
skupne kisline (g/L)	5,05	6,26	5,66	0,61
hlapne kisline (g/L)	0,35	0,31	0,33	0,02
vrednost pH	3,53	3,44	3,48	0,04
jabolčna kislina (g/L)	0,06	1,94	1,00	0,94
mlečna kislina (g/L)	1,44	0,42	0,93	0,51
vinska kislina (g/L)	1,82	1,80	1,81	0,01
glicerol (g/L)	7,13	7,14	7,14	0,01
skupne fenolne spojine (mg/L)	362,2	357,7	359,95	2,25
antioksidativni potencial (mmol/L)	1,925	2,269	2,097	0,172
fermentacijska učinkovitost (g/L·vol %)	17,06	17,15	17,11	0,05

Priloga D: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Lalvin ICV OKAY, hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemend OMEGA

parametri/ oznaka vzorca	4	11	povpr. vrednost	σ (SD)
relativna gostota (/)	0,9922	0,9921	0,9922	0,0000
alkohol (vol.%)	11,99	11,99	11,99	0,00
skupni suhi ekstrakt (g/L)	21,47	21,33	21,40	0,07
reducirajoči sladkorji (g/L)	1,46	1,51	1,485	0,03
sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	20,01	19,82	19,92	0,10
skupne kisline (g/L)	5,36	5,28	5,32	0,04
hlapne kisline (g/L)	0,52	0,53	0,52	0,01
vrednost pH	3,534	3,53	3,53	0,00
jabolčna kislina (g/L)	0,10	0,07	0,09	0,02
mlečna kislina (g/L)	1,85	1,80	1,825	0,03
vinska kislina (g/L)	1,67	1,67	1,67	0,00
glicerol (g/L)	7,05	6,88	6,97	0,09
skupne fenolne spojine (mg/L)	362,2	348,7	355,5	6,8
antioksidativni potencial (mmol/L)	2,235	1,991	2,113	0,122
fermentacijska učinkovitost (g/L·vol %)	17,12	17,11	17,12	0,01

Priloga E: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Uvaferm SLO

parametri/ oznaka vzorca	5	12	povpr. vrednost	σ (SD)
relativna gostota (/)	0,9937	0,9942	0,9940	0,0003
alkohol (vol. %)	11,81	11,79	11,80	0,01
skupni suhi ekstrakt (g/L)	24,47	25,21	24,84	0,37
reducirajoči sladkorji (g/L)	5,14	5,30	5,22	0,08
sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	19,33	19,91	19,62	0,29
skupne kisline (g/L)	5,09	6,28	5,69	0,60
hlapne kisline (g/L)	0,63	0,56	0,60	0,04
vrednost pH	3,57	3,45	3,51	0,06
jabolčna kislina (g/L)	0,32	2,35	1,34	1,02
mlečna kislina (g/L)	1,40	0,23	0,82	0,59
vinska kislina (g/L)	1,88	1,87	1,88	0,01
glicerol (g/L)	7,13	6,93	7,03	0,10
skupne fenolne spojine (mg/L)	364,7	370,2	367,5	2,8
antioksidativni potencial (mmol/L)	1,952	1,965	1,959	0,007
fermentacijska učinkovitost (g/L·vol %)	17,07	17,08	17,08	0,01

Priloga F: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Uvaferm SLO in hranila za kvasovke RESKUE

parametri/ oznaka vzorca	6	13	povpr. vrednost	σ (SD)
relativna gostota (/)	0,9933	0,9931	0,9932	0,0001
alkohol (vol. %)	11,88	11,89	11,89	0,01
skupni suhi ekstrakt (g/L)	23,32	22,97	23,15	0,18
reducirajoči sladkorji (g/L)	3,11	2,37	2,74	0,37
sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	20,21	20,60	20,41	0,20
skupne kisline (g/L)	6,11	6,38	6,25	0,14
hlapne kisline (g/L)	0,61	0,58	0,59	0,01
vrednost pH	3,46	3,45	3,46	0,01
jabolčna kislina (g/L)	2,00	2,28	2,14	0,14
mlečna kislina (g/L)	0,33	0,20	0,27	0,07
vinska kislina (g/L)	1,75	1,75	1,75	0,00
glicerol (g/L)	7,17	7,24	7,21	0,04
skupne fenolne spojine (mg/L)	333,7	346,2	340,0	6,3
antioksidativni potencial (mmol/L)	1,945	2,049	1,997	0,052
fermentacijska učinkovitost (g/L·vol %)	17,14	17,19	17,17	0,03

Priloga G: Rezultati rezultati fizikalno-kemijskih analiz za vzorca z dodatkom kvasovk Uvaferm SLO, hranila za kvasovke RESKUE in mlečnokislinskih bakterij Lallemend OMEGA

parametri/ oznaka vzorca	7	14	povpr. vrednost	σ (SD)
relativna gostota (/)	0,9932	0,9928	0,9930	0,0002
alkohol (vol.%)	11,79	11,85	11,82	0,03
skupni suhi ekstrakt (g/L)	23,20	22,46	22,83	0,37
reducirajoči sladkorji (g/L)	3,85	3,09	3,47	0,38
sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	19,35	19,37	19,36	0,01
skupne kisline (g/L)	5,42	5,34	5,38	0,04
hlapne kisline (g/L)	0,94	0,91	0,92	0,02
vrednost pH	3,54	3,55	3,55	0,00
jabolčna kislina (g/L)	0,09	0,08	0,09	0,01
mlečna kislina (g/L)	1,76	1,78	1,77	0,00
vinska kislina (g/L)	1,58	1,60	1,59	0,00
glicerol (g/L)	7,49	7,38	7,44	0,06
skupne fenolne spojine (mg/L)	366,2	352,7	359,5	6,8
antioksidativni potencial (mmol/L)	2,251	2,271	2,261	0,010
fermentacijska učinkovitost (g/L·vol %)	17,21	17,18	17,20	0,02

Priloga H: Degustacijski list za senzorično ocenjevanje mladih vin po metodi 20-točkovnega sistema po Buxbaumu

SAMOSTOJNO OCENJEVANJE PRIDELANIH MLADIH VIN

1.del: ocenjevanje po veljavnem 20-točkovnem sistemu po Buxbaumu

Ocenjujemo najprej šest vzorcev belega vina (svojega in nato še pet od sošolcev); v prvi vrsti obrazca so napisane zaporedne številke, v drugo vrstico pa sami napišete **kodo (številko) vzorca!**

Parameter	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Bistrost (2)						
Barva (2)						
Vonj (4)						
Okus (6)						
Harmonija (6)						
SKUPAJ (20)						

Podpis: _____

Priloga I: Degustacijski list za senzorično ocenjevanje mladih vin po metodi Hitrega profiliranja

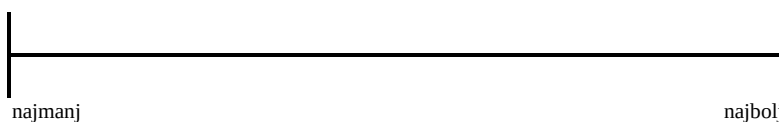
Priimek in ime: _____

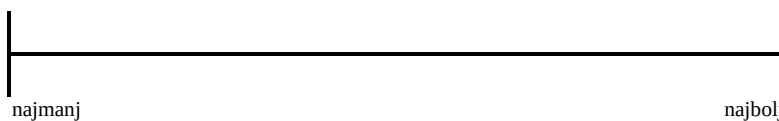
Oznaka preskuševalca: _____

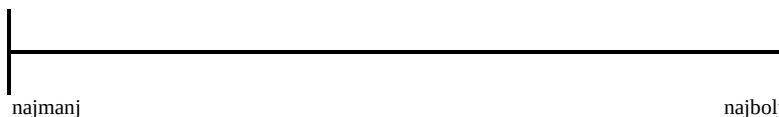
HITRO PROFILIRANJE (FLASH PROFILING)

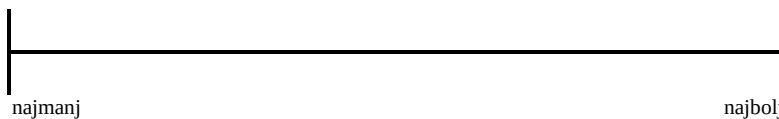
Najprej pokusite vzorce, na črto napišite opisnik. Intenzivnost izraženega opisnika v vzorcih ocenite na lestvici (črtica in oznaka vzorca).

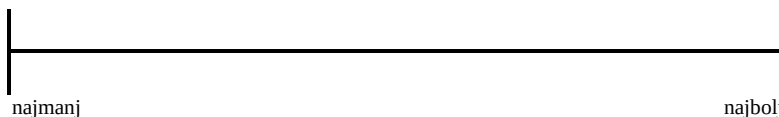
BELA VINA











Podpis preskuševalca: _____

Priloga J: Degustacijski list za senzorično ocenjevanje mladih vin po metodi CATA

Priimek in ime: _____ **Oznaka preskuševalca:** _____

Ocenjevanje arome vina z metodo CATA ("Check all that apply") - "Označi vse, kar ustreza"

BELA VINA

Opis lastnosti	senzorične	Koda vzorca:	Koda vzorca:	Koda vzorca:	Koda vzorca:	Koda vzorca:	Koda vzorca:
po marelici							
po akaciji							
po ananasu							
po glogu							
po banani							
po citrusih							
po kutini							
po tropskem sadju							
po muškatu							
po senu							
po maslu							
po medu							
po lešnikih/orehih							
po jabolkih							
po hruški							
po lipi							
po mošusu							
po zeliščih							
po suhem sadju							
plehka, prazna aroma							
srednje intenzivna aroma							
neprijetna aroma							

Podpis preskuševalca: _____

Priloga K: Degustacijski list za senzorično ocenjevanje mladih vin po metodi Ocenjavanja všečnosti z 9-točkovno hedonsko lestvico

Priimek in ime: _____ Oznaka preskuševalca: _____

Ocenjevanje všečnosti z 9-točkovno hedonsko lestvico

BELA VINA

vzorec _____	ekstremno ne ugaja	zelo ne ugaja	dokaj ne ugaja	rahlo ne ugaja	ni ti ugaja ni ti ne ugaja	rahlo ugaja	dokaj ugaja	zelo ugaja	ekstremno ugaja
vzorec _____	ekstremno ne ugaja	zelo ne ugaja	dokaj ne ugaja	rahlo ne ugaja	ni ti ugaja ni ti ne ugaja	rahlo ugaja	dokaj ugaja	zelo ugaja	ekstremno ugaja
vzorec _____	ekstremno ne ugaja	zelo ne ugaja	dokaj ne ugaja	rahlo ne ugaja	ni ti ugaja ni ti ne ugaja	rahlo ugaja	dokaj ugaja	zelo ugaja	ekstremno ugaja
vzorec _____	ekstremno ne ugaja	zelo ne ugaja	dokaj ne ugaja	rahlo ne ugaja	ni ti ugaja ni ti ne ugaja	rahlo ugaja	dokaj ugaja	zelo ugaja	ekstremno ugaja
vzorec _____	ekstremno ne ugaja	zelo ne ugaja	dokaj ne ugaja	rahlo ne ugaja	ni ti ugaja ni ti ne ugaja	rahlo ugaja	dokaj ugaja	zelo ugaja	ekstremno ugaja
vzorec _____	ekstremno ne ugaja	zelo ne ugaja	dokaj ne ugaja	rahlo ne ugaja	ni ti ugaja ni ti ne ugaja	rahlo ugaja	dokaj ugaja	zelo ugaja	ekstremno ugaja

Podpis preskuševalca: _____